

**Multidrog rezisztens tumorsejtek szelektív eliminálására képes  
vegyületek azonosítása és *in vitro* vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés



**Türk Dóra**

Témavezető:  
Dr. Szakács Gergely  
MTA TTK ENZIMOLÓGIAI INTÉZET

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
Iskolavezető: Prof. Dr. Erdei Anna  
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS NEUROBIOLÓGIA PROGRAM  
Programvezető: Prof. Dr. Sass Miklós

Budapest, 2014



## TARTALOMJEGYZÉK

1	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	8
1.1	Bevezetés .....	8
1.2	Kemoterápiás rezisztencia a hagyományos és a célzott rákterápiában.....	9
1.2.1	A hagyományos és a célzott rákterápia .....	10
1.2.2	A hagyományos és a célzott kemoterápiás szerek által kiváltott intracelluláris rezisztencia mechanizmusok.....	12
1.2.2.1	Az aktív hatóanyagok sejten belüli koncentrációját csökkentő rezisztencia mechanizmusok.....	13
1.2.2.2	A célmolekulák funkcióját biztosító rezisztencia mechanizmusok.....	14
1.2.2.3	A sejtciklus gátlását és az apoptózis végrehajtását akadályozó rezisztencia mechanizmusok.....	15
1.3	Multidrog rezisztencia .....	17
1.3.1	A multidrog rezisztens sejtfenotípus .....	17
1.3.2	A humán multidrog transzporterek .....	18
1.3.3	A humán ABCB1 multidrog transzporter .....	24
1.3.3.1	Az ABCB1 kristályszerkezete és működése .....	24
1.3.3.2	Az ABCB1 transzporter jelentősége a klinikai multidrog rezisztenciában ....	26
1.3.3.3	Az ABCB1 transzporter fiziológiás szerepe.....	28
1.4	A multidrog rezisztencia megoldását célzó megközelítések .....	30
1.4.1	Transzporter funkció gátlása inhibitor vegyületekkel.....	30
1.4.2	További megközelítések a multidrog rezisztencia kiküszöbölésére .....	31
1.5	A kollaterális szenzitivitás jelensége.....	32
1.5.1	A kollaterális szenzitivitás a prokarióták és eukarióták körében .....	32
1.5.2	Egyetlen fehérje megváltozott expressziója vagy mutációja által okozott kollaterális szenzitivitás az antimikrobiális kemoterápiában.....	35
1.5.3	Rezisztens tumorsejtek kollaterális érzékenysége.....	36
1.5.4	A multidrog rezisztens fenotípushoz köthető kollaterális érzékenység .....	38
1.5.4.1	A multidrog transzporter ABCC1 kifejeződéséhez köthető kollaterális érzékenység .....	38
1.5.4.2	A multidrog transzporter ABCB1 kifejeződéséhez köthető kollaterális érzékenység .....	39
1.5.4.3	A tioszemikarbazon NSC73306 által kiváltott ABCB1 funkció-függő kollaterális érzékenység .....	41
1.6	A National Cancer Institute Developmental Therapeutics Programja és az NCI-60 tumorsejtpanel .....	42
2	CÉLKITŰZÉSEK.....	44
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	45

3.1	Felhasznált anyagok és vegyületek.....	45
3.2	A Developmental Therapeutics Program adatbázisa.....	45
3.3	Az NCI-60 tumorsejtpanel ABCB1 mRNS expressziójának és drogérzékenységének korrelációs analízise .....	46
3.4	A vegyületek kémiai hasonlóságának elemzése .....	46
3.5	Sejtvonalak és tenyésztési kondíciók .....	46
3.6	Citotoxicitás vizsgálat.....	47
3.7	Drogkezelés .....	48
3.8	<i>Sleeping Beauty</i> transzpozon vektor konstrukciók előállítása.....	48
3.9	Vad típusú és „Walker A” mutáns ABCB1 transzportert kifejező MDCKII sejtvonalak előállítása.....	49
3.10	Sejtfelszíni humán ABCB1 expresszió mérése áramlási citometriával.....	49
3.11	Az ABCB1 transzporter funkció mérése calcein-AM esszével.....	50
3.12	Az ABCB1 transzporter funkció mérése rhodamine123 akkumulációval .....	51
3.13	Teljes RNS izolálás .....	51
3.14	cDNS átírás.....	51
3.15	Real-time PCR.....	52
3.16	Western blot.....	52
4	EREDMÉNYEK.....	53
4.1	MDR-szelektív molekulák azonosítása a Developmental Therapeutics Program vegyülettárából korrelációs analízissel és kémiai szerkezeti hasonlóság alapján .....	53
4.1.1	MDR-szelektív molekulajelöltek azonosítása az NCI-60 sejtpanel ABCB1 expressziós és drogérzékenységi mintázatának korrelációs analízisével.....	53
4.1.2	Az MDR-szelektív aktivitás igazolása citotoxicitási vizsgálatokkal .....	56
4.1.3	A 64 feltételezett MDR-szelektív vegyület kémiai diverzitásának jellemzése klaszteranalízissel .....	57
4.1.4	Az MDR-szelektív aktivitás ABCB1 funkció-függésének vizsgálata specifikus transzporter inhibitor alkalmazásával .....	60
4.1.5	Az MDR-szelektív aktivitás ABCB1 funkció-függésének elemzése az ATP-áz deficiens, “Walker A” mutáns transzporter vizsgálatával .....	61
4.1.5.1	“Walker A” mutáns ABCB1 transzportert overexpresszáló stabil sejtvonalak létrehozása.....	61
4.1.5.2	A vad típusú és a “Walker A” mutáns ABCB1 transzportert overexpresszáló MDCKII sejtvonalak fehérje expressziós és funkcionális jellemzése.....	63
4.1.5.3	Az MDR-szelektív vegyületek ABCB1 funkció-függő aktivitásának vizsgálata ATP-áz deficiens, funkcióképtelen mutáns transzportert kifejező sejteken .....	65
4.1.6	MDR-szelektív vegyületek azonosítása kémiai szerkezeti hasonlóság alapján .....	67
4.1.7	A fémion kötés MDR-szelektív aktivitásban betöltött szerepének vizsgálata ...	70
4.2	Az MDR-szelektív vegyületek citotoxikus hatásának vizsgálata az ABCG2 multidrog transzporter jelenlétében .....	73

4.3	Az MDR-szelektív vegyületek hatása MDR tumorsejtvonalak drogérzékenységére és ABCB1 expressziójára .....	76
4.3.1	Az MDR tumorsejtvonalak MDR-szelektív vegyületekkel való hosszútávú kezelésének hatása a sejtek drogérzékenységére .....	76
4.3.2	Az MDR-szelektív vegyületek hatása az MDR sejtvonalak ABCB1 expressziójára.....	77
4.3.3	Az MDR-szelektív vegyületek ABCB1 fehérje expressziót és funkciót csökkentő hatásának vizsgálata áramlási citometriával.....	80
4.3.4	Az ABCB1 inhibitor XR9576 hatása az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott transzporter expresszió csökkenésre.....	81
5	EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE .....	84
6	ÖSSZEFOGLALÁS .....	91
7	SUMMARY .....	92
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	93
9	KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE .....	94
9.1	Az értekezés témájában megjelent saját közlemények.....	94
9.2	Egyéb közlemények.....	94
10	HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE .....	95

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP binding cassette
ABCP	placental ABC protein
ADME	absorbtion, distribution, metabolism, excretion
AML	acute myeloid leukemia
AMV	avian myeloblastosis virus
AP-1	activator protein 1
ASR	age-standardised rate
ATCC	american type culture collection
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein kinase
AUC	area under the curve
Bcr-Abl	breakpoint cluster region-Abelson kinase
BCRP	breast cancer resistance protein
BSO	butionin szulfoximin
CAF	ciklofoszfamid-adriamicin-fluorouracil
calcein-AM	calcein-acetoxi-metilészter
CaMDR1	<i>Candida albicans</i> multidrog rezisztencia protein 1
CDK	ciklin-dependens kináz
CDR1	<i>Candida</i> rezisztencia protein 1
CDR2	<i>Candida</i> rezisztencia protein 2
CFTR	cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CHO	Chinese hamster ovary
CML	chronic myeloid leukemia
C-Myc	myelocytomatosis oncogene
CTR1	copper transporter 1
CSA	cyclosporin A
DDI	drog-drog interakció
DDR	DNA damage response
DFO	deferrioxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTP	Developmental Therapeutics Program
ECL	enhanced chemiluminescence
EGFR	epidermal growth factor receptor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FMDP	methoxyfumaroyl-diaminopropanoic acid
FSC	forward scatter
FTC	fumitremorgin C
GAM	goat anti-mouse
GCS	glutamilsztein szintetáz

GI <sub>50</sub>	growth inhibition 50
GLUT-1	glükóz transzporter 1
GSH	glutathione
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
HIV	human immunodeficiency virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50
Lyn	Lck/Yes novel tyrosine kinase
mAb	monoclonal antibody
MAF	multidrug resistance activity factor
MCAK	mitotic centromere associated kinesin
MDCKII	Madin-Darby canine kidney 2
MDR	multidrog rezisztencia, multiple drug resistance
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanin-metiltranszferáz
MRP1	multidrug resistance associated protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin protein kinase
MTT	(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium)bromid
MXR	mitoxantrone resistance protein
NBD	nucleotide binding domain
NCI	National Cancer Institute
NF-κB	nuclear factor-kappaB
NIH	National Institute of Health
PBS	phosphate-buffered saline
PCFT	proton coupled folate transporter
PCR	polymerase chain reaction
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
PI3K	phosphatidylinosi-4,5-bisphosphate 3 kinase
PVDF	polyvinylidene fluoride
ROS	reactive oxygen species
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
SDS	sodium dodecyl sulphate
siRNS	small interfering RNS
SOM	self organizing map
SRB	sulphorhodamine B
SSC	side scatter
TAP1/TAP2	transporter associated with antigen processing
TBS	Tris-buffered saline
TMD	transzmembrán domén
WHO	World Health Organization

# 1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1 Bevezetés

A World Health Organization (WHO) 2011-es évre vonatkozó elemzése a rákos megbetegedéseket továbbra is a vezető halálokok közé sorolja. A magas jövedelmű országokban - köztük hazánkban is - a leggyakoribb halálozási ok a szív- és érrendszeri megbetegedések után közvetlenül a tüdőrák (a WHO adatai alapján, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>). A 2012-es évben Európában 3,45 millió új rákos megbetegedést és 1,75 millió halálesetet állapított meg az International Agency for Research on Cancer (IARC) [1]. A férfiak körében a tüdőrák után a kolorektális daganatok és a prosztatarák vezet a mortalitási statisztikákat (ASR, Age-standardised Rate), míg a nők között a mellrák, tüdőrák és a kolorektális daganatok állnak az első három helyen [2].

A molekuláris- és tumorsejtbiológia fejlődésével megjelenő új diagnosztikai módszerek és hatékonyabb terápiás eljárások a megelőzési programokkal együtt [3] is csak kis mértékben csökkentették az Egyesült Államok és Európa mortalitási mutatóit az elmúlt években (az európai régióban 2009 és 2013 között 4-6% az összes rákbetegség kor-standardizált adatait tekintve) [2, 4].

Az ép szövetek között szaporodó, sebészeti úton nem eltávolítható tumorsejtek elpusztítása a rákbetegségek egyedülálló sokfélesége, és a szelektív, a szervezet egészséges szöveteit kímélő sejtpusztítás szükségessége miatt rendkívül nehéz feladat.

A rákgyógyítást tovább nehezíti a ráksejtek citotoxikus hatásokkal szembeni ellenállóképessége, rezisztenciája, melyet különböző, tumorsejtekben működő molekuláris mechanizmusok biztosítanak. Elsősorban ezek az intracelluláris rezisztencia mechanizmusok felelősek a kezdetben hatékonynak bizonyuló terápiás szereknek a kezelés későbbi szakaszában jelentkező hatástalanságáért [5].

A tumorok rendkívüli heterogenitását és darwini evolúciós szabályok szerint való szerveződését és fejlődését igazoló [6-9] újabb eredmények szerint a kezelések során megjelenő rezisztencia a rák inherens tulajdonsága. Mivel a tumorban az eltérő mikrokörnyezetek sokasága egyszerre számos mikroevolúciós folyamatot tart fenn, az adaptálódott ráksejt-fenotípusok száma egyetlen tumoron belül is igen nagy. A toxikus terápia erős szelekciós nyomása ebből a sokféleségből „válogatja ki” az intracelluláris rezisztencia mechanizmusok által védett, túlélő tumorsejtklónokat. A tömeges tumorsejtpusztítás révén felszabaduló üres niche segíti a rezisztens klónok expanzióját, az



új, már rezisztens tulajdonságú tumor felépítését. A kezelés során kialakuló rezisztencia tehát a rákfejlődés dinamikájából következő védettség, mellyel a rákgyógyításnak minden esetben számolnia kell [10].

A probléma megoldását nehezíti, hogy bizonyos rezisztencia mechanizmusok nemcsak egy adott kemoterapeutikummal, hanem több további, akár eltérő hatásmechanizmusú hatóanyaggal szemben is védelmet biztosíthatnak. A kemoterápiás szerekkel szemben kialakuló legszélesebb körű ellenállóképességet biztosító ún. multidrog rezisztencia (MDR) kialakulása klinikai adatok alapján is összefüggést mutat a tumorsejtek plazmamembránjában kifejeződő P-glikoprotein működésével. A több ráktípus esetében is (mellrák és kissejtes tüdőrák [11], akut mieloid leukémia [12]) megfigyelt összefüggésből kiindulva az utóbbi évtizedekben számos próbálkozás célozta a fehérje funkciójának kiiktatását ill. megkerülését, egyelőre a klinikumban sikertelenül [13].

A következőkben a tumorsejtek védettségét eredményező intracelluláris rezisztencia-mechanizmusokat fogom áttekinteni, különös tekintettel a P-glikoprotein szerepére, majd a rezisztens sejtekre jellemző ún. túlérzékenység vagy kollaterális érzékenység jelenségét fogom bemutatni. Doktori munkám során a P-glikoprotein működése által okozott túlérzékenységgel, mint a rezisztens sejtek pusztítására alkalmas új megközelítéssel foglalkoztam.

## **1.2 Kemoterápiás rezisztencia a hagyományos és a célzott rákterápiában**

A kemoterápia a rákgyógyítás kiemelten fontos eszköze, mely a tumorsejtekre toxikus hatóanyagokat a vérkeringésen keresztül az egész szervezetbe eljuttatva, alkalmas az ismeretlen elhelyezkedésű, sebészeti úton nem eltávolítható daganatok, metasztázisok elpusztítására is.

A kemoterapeutikumokkal való gyógyítást azonban a betegek jelentős részében akadályozza az ún. terápiás rezisztencia jelentkezése, mikor az adott hatóanyag maximálisan tolerált dózisének alkalmazása mellett sem alakul ki terápiás válasz, azaz a kezelés hatástalannak bizonyul. A gyógyítás ilyen esetben eltérő hatásmechanizmusú, a beteg kezelése során még nem alkalmazott hatóanyagokkal folytatható, ám sok esetben a kialakuló rezisztencia olyan széleskörű, hogy számos, különböző kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú szer toxicitása ellen is védettséget biztosít, komolyan veszélyeztetve a beteg gyógyulását [14].

A rezisztenciának számos kiváltó oka ismert [14]. A beteg egyedi genetikai adottságai a felszívódásban, szövetek közötti eloszlásban, metabolizmusban és kiválasztásban szerepet játszó enzimek és transzporterek tulajdonságain keresztül jelentősen befolyásolhatják a hatóanyagok vérkoncentrációját (AUC, area under the curve), ezzel a tumorsejtekhez eljutó terápiás szer mennyiségét. A szolid tumorok és környezetük egyedi sajátosságai: az alacsony mértékű vaszkularizáltság, a kedvezőtlen perfúziós tulajdonságok, az alacsony pH, a hypoxia szintén vezethetnek farmakológiai rezisztencia kialakulásához, mivel a tumorsejtekhez eljutó aktív hatóanyag mennyiségét csökkentik [14].

A terápiás rezisztencia kialakulása sok esetben a sejtes rezisztenciának, azaz a tumorsejtek intracelluláris mechanizmusokon alapuló saját ellenállóképességnek a következménye. A metasztatikus rákbetegségek 90%-ában a tumorsejtek rezisztens fenotípusa felelős a terápiás válasz elmaradásáért [5]. A védettség, mely az alkalmazott hatóanyag hatásmechanizmusától függően bizonyos fehérjék fokozott, vagy csökkent működésén alapul, lehet eredendően hordozott, az egészséges szövet sejtjeire jellemző, vagy az onkogenezis során kialakuló tulajdonság (intrinsic resistance: elsődleges rezisztencia), és lehet a kemoterápiás kezelés toxikus hatása által indukált, szerzett (acquired resistance: szerzett rezisztencia) molekuláris változás [13].

Mivel a kemoterápiában alkalmazott rákellenes szerek nagy részénél a dózis jelentős emelése a súlyos mellékhatások veszélye miatt nem lehetséges, ezért a ráksejtek drogérzékenységében bekövetkező kismértékű csökkenés is rezisztencia kialakulásához vezethet [14].

A rákos megbetegedések hatékonyabb gyógyítására az utóbbi évtizedekben új terápiás koncepció alakult ki, mely a tumorsejtekre nagymértékben specifikus, ugyanakkor a szervezet egészséges szövetei számára jól tolerálható hatóanyagokat alkalmaz (célzott terápia).

### **1.2.1 A hagyományos és a célzott rákterápia**

A sebészeti eltávolítással és a lokális hatású sugárkezeléssel ellentétben a kemoterápiának, és minden olyan modern eljárásnak (pl. immunterápia), amely a vérkeringésen keresztül juttatja el a hatóanyagot a tumorsejtekhez, szelektív hatásmechanizmussal kell rendelkeznie.

A hagyományos kemoterápiás szerek citosztatikumok, melyek az „osztódó sejtállapot” megváltozott élettani folyamatait kihasználva váltanak ki nagyobb toxikus hatást a

folyamatosan osztódó tumorsejtekben, míg a szervezet differenciált, nem osztódó szövetei kevésbé érzékenyek ezen hatóanyagok toxikus hatására. A ráksejtek érzékenyebbek a nukleotidok és aminosavak szintézisét gátló ún. antimetabolitokkal szemben (pl. antifolátok: metotrexát [15], pirimidin analógok: 5-fluorouracil [16]), mivel a folyamatos DNS és fehérje szintézis miatt energia- és anyagigényük a nem osztódó sejtekhez képest magasabb. A maghártya hiánya és a DNS replikációja miatt a tumorsejtek örökítőanyaga könnyebben károsítható, akár a DNS szálak keresztkötését okozó alkiláló ágensekkel (carmustin) [17], akár a DNS szintézist megakasztó nukleotid analógokkal (pl. gemcitabin) [18] ill. DNS kettős töréseket okozó topoizomeráz inhibitorokkal (pl. camptotecin, doxorubicin) [19]. A sejtosztódáshoz nélkülözhetetlen a citoszkeleton elemeinek szabályozott bontása, a mitotikus orsó felépülése és működése. Az ún. mitotikus mérgek a mikrotubulusok  $\beta$ -tubulin molekuláihoz kötődve stabilizálják (pl. paclitaxel), vagy destabilizálják (pl. vinblasztin) a mikrotubulusokat, gátolva a tumorsejtek osztódását [20] [21].

A hagyományos citosztatikumok alkalmazása során gyakran lépnek fel súlyos mellékhatások [22], mivel a differenciált normál szövetek utánpótlását szintén osztódó, egészséges szövetek (pl. vérképző őssejtek és progenitorok, Lieberkühn-féle kripták osztódó epitélsejtjei, ivarsejtképző sejtek, hajhagymák osztódó sejtjei és minden szöveti őssejt) biztosítják.

Az utóbbi évtizedekben a molekuláris tumorsejtbiológia új eredményeire alapozva lehetővé vált, hogy a rákterápia a citotoxikus hatást a tumorsejtekhez lokalizálja. Az ún. célzott terápia („targeted therapy”) tumorsejt- ill. tumorspecifikus tulajdonságokat azonosít és használ fel a sejtpusztításhoz: a ráksejtek malignus tulajdonságait („hallmarks of cancer” [23, 24]) fenntartó intracelluláris mechanizmusokat, a tumor sztróma onkogenezist támogató folyamatait [25], a tumorkörnyezet megváltozott kémiai paramétereit (hypoxia, alacsony pH) [26].

A folyamatosan stimulált proliferációs és túlélést támogató jelátvitel az egyik legáltalánosabb ráksejt tulajdonság, melyet sok esetben a növekedési faktor receptorok, ill. a jelátvitelben szerepet játszó kinázok konstitutív működését eredményező aktiváló mutációk okoznak. A CML (krónikus mieloid leukémia) onkogenezisében fő szerepet játszó fúziós BCR-Abl kináz [27], a többek között nem kisgyermes tüdőrák sejteken kifejeződő mutáns HER2 EGF receptor [28] konstitutív aktivitása tirozin kináz inhibitorokkal (imatinib ill. gefitinib és erlotinib) hatékonyan gátolható [29]. A mutáns B-

Raf kináz [30], a proteaszóma [31] és az angiogenezis gátlása [32] szintén a klinikumban alkalmazott célzott terápiás megközelítések közé tartozik.

A ráksejtekre specifikus, sejtfelszínen hozzáférhető membránfehérjék lehetővé teszik antigén-specifikus monoklonális antitestek (mAb) alkalmazását a rákgyógyításban. A vérkeringésbe juttatott ellenanyagok nagy affinitású kötődése egyrészt gátolja a növekedési faktor receptorok működését (EGFR: cetuximab [33], HER2: trastuzumab [34]), másrészt radioaktív molekulákkal vagy toxinokkal konjugálva a ráksejtekhez irányítja a citotoxikus hatást [35].

Hatékonyaságuk és kedvező mellékhatás profiljuk miatt ma már több célzott terápiás szert alkalmaznak a klinikumban elsődleges terápiaként (pl. imatinib [36], sunitinib [37]). Annak ellenére, hogy ezek a hatóanyagok csak bizonyos, a speciális tumorsejt bélyegeket hordozó betegcsoportokban, és sok esetben csak hagyományos kemoterápiával együtt alkalmazhatóak, több ráktípus esetében is jelentősen javították a betegek gyógyulási és túlélési statisztikáit [38-40]. A terápiás rezisztencia azonban a célzott kemoterápia esetében is igen gyakran, hatásmechanizmustól függetlenül megjelenik és megakadályozza a betegek gyógyulását [41, 42].

### **1.2.2 A hagyományos és a célzott kemoterápiás szerek által kiváltott intracelluláris rezisztencia mechanizmusok**

A hagyományos és célzott kemoterápiás szerek célmolekuláik gátlása vagy károsítása révén váltják ki citotoxikus hatásukat. A károsodott sejtek osztódásának gátlásához és a sejtpusztítás kiváltásához a sejtciklust és a sejthalált (apoptózis) szabályozó apparátusok megfelelő működése is szükséges.

Ennek megfelelően megfigyelhetők olyan rezisztencia mechanizmusok, melyek a terapeutikumok intracelluláris koncentrációját csökkentik, a sejtciklus gátlását és az apoptózis folyamatait akadályozzák, ill. olyan mechanizmusok, melyek képesek a célmolekulák (DNS, fehérjék) működését fenntartani vagy pótolni. Fontos megjegyezni, hogy a tumorsejtek „tumor fenotípust” biztosító deregulált jelpályái a folyamatos proliferációs és túlélést támogató szignálok fenntartásával ill. az apoptotikus jelátvitel és a sejtciklus megállításának gátlása révén egyúttal a toxikumok által indukált stressz-környezetben is segíthetik a tumorsejtek túlélését, azaz résztvehetnek a rezisztencia kialakításában (intrinsic resistance) [14].

### **1.2.2.1 Az aktív hatóanyagok sejten belüli koncentrációját csökkentő rezisztencia mechanizmusok**

A hatóanyagok intracelluláris térbe való bejutását alapvetően a plazmamembrán áteresztőképessége határozza meg. A hidrofób tulajdonságú, semleges gyógyszermolekulák bizonyos mérethatárig a külső és belső sejtter között szabad diffúzióval közlekednek, míg a töltéssel rendelkező, vagy hidrofil vegyületek kizárólag membránfehérjék működése révén juthatnak a sejtekbe.

Az első esetben megvalósuló szabad beáramlást aktív, ellenirányú transzportfolyamat ellensúlyozhatja, mely bizonyos ABC (ATP binding cassette) típusú membránfehérjék plazmamembránban való kifejeződése és működése révén a hatóanyagokat visszajuttatja az extracelluláris térbe. Ez az efflux mechanizmus a sejten belüli hatóanyag koncentrációt jelentősen csökkentve megakadályozza a célmolekulák gátlását, illetve károsítását. Ezen ún. multidrog transzporterek kifejeződése az egyik leggyakrabban jelentkező sejtes rezisztencia mechanizmus, mely a terápiás szerek hatásmechanizmusától függetlenül biztosít védeltséget a tumorsejteknek. A rendkívül széleskörű ellenállóképességet eredményező, ezért kiemelt jelentőségű multidrog rezisztencia jelenségének részletes tárgyalását az 1.3 fejezet tartalmazza.

A második esetben a sejtes rezisztencia a hatóanyagok intracelluláris irányú transzportját végző plazmamembrán fehérjék funkciójának csökkenése révén valósulhat meg. Az antifolatokkal szemben kialakuló védeltségben ilyen módon a PCFT (proton coupled folate transporter) transzporter csökkent kifejeződésének és inaktíváló mutációinak [15], míg a ciszplatin rezisztencia esetében a hatóanyagot a sejtbe juttató CTR1 (copper transporter) transzporter plazmamembránból való internalizációjának van fontos szerepe [43].

A keringésbe juttatott kemoterapeutikumok sok esetben toxikus hatással nem rendelkező pro-drogok, melyek a citoplazmában a tumorsejtek anyagszere enzimeinek funkciójára alakulhatnak aktív hatóanyagokká. A citozin arabinozid antimetabolikus hatásához a deoxicitidin-kináz foszforiláló funkciójára van szükség [44], míg a toxikus 5-fluorouracil létrejöttéhez a capecitabine pirimidin analóggá (5-fluorouracil) és cukorrá való bontására van szükség, melyet a timidin-foszforiláz enzim végez. A pro-drogokat aktiváló enzimfehérjék csökkent funkciójára tehát, mutáció vagy alacsony expresszió következményeként, sejtes rezisztencia kialakulásához vezethet [45].

Ellentétes irányú folyamat az aktív hatóanyagok lebontását, inaktiválását végző enzimműködés fokozódása, mely igen általános védőmechanizmus. A platina tartalmú citosztatikumok (pl. ciszplatin, carboplatin) glutationnal való konjugáció következtében inaktiválódnak, ezért a tumorsejtek magas GSH tartalma csökkentheti a citotoxikus hatást [46]. Bizonyos metabolizáló enzimek (dihidropirimidin-dehidrogenáz ill. gamma-glutamil hidroláz) megnövekedett aktivitása jelentősen redukálhatja a tumorsejtek fluorouracil ill. antifolát tartalmát, a szerek toxikus hatását [47].

#### **1.2.2.2 A célmolekulák funkcióját biztosító rezisztencia mechanizmusok**

A kemoterapeutikumok számos esetben egy, a tumorsejt számára kiemelten fontos enzimfehérje működését gátolják (antifolátok, kináz gátlók). A rezisztenciát ezekben az esetekben a fehérjék overexpressziója vagy missense mutációja biztosíthatja. Előbbi az inhibitor vegyület és a fehérje moláris arányát jelentősen csökkentve biztosítja a fehérje funkcióját és sok esetben génamplifikáció következménye, míg utóbbi pontmutációkon vagy deléciókon keresztül csökkenti a kemoterapeutikumok kötődési affinitását a mutáns fehérjéhez. A tumorsejtek a gátolt célfehérjék (pl. BCR-Abl tirozin kináz) funkciójának helyettesítésével is védetséghez juthatnak, egy hasonló szerepet ellátó fehérjét overexpresszálva (pl. Lyn tirozin kináz, [48]). A célzott terápiás tirozin kináz inhibitorok (imatinib, gefitinib, erlotinib) esetében rendelkezésre álló nagy mennyiségű klinikai adat alapján a betegekben leggyakrabban detektált rezisztencia mechanizmus a pontmutációk megjelenése [15].

A mikrotubulus rendszer működését támadó mitotikus mérgek a tubulin alegységek egymáshoz való kötődési affinitását csökkentve vagy növelve zavarják meg a mikrotubulusok bomlásának és épülésének egyensúlyát. Ebben az esetben a  $\beta$ -tubulin alegységek affinitást befolyásoló mutációi okozhatnak rezisztenciát. Az eltérő tubulin konformációval rendelkező  $\beta$ III- és  $\beta$ V-tubulin izoformák expressziós arányának változása, a mikrotubulusok regulációjában résztvevő, stabilitást befolyásoló fehérjék (pl. MCAK, mitotic centromere associated kinesin) megváltozott expressziója szintén hozzájárulhat védetség kialakulásához [49].

A genetikai anyag károsítását számos citosztatikum célozza, mivel a DNS sérülése a sejtciklus gátlásához, illetve a DNS maradandó károsodása esetén sejthalálához (apoptózis) vezet. A DNS sérülését direkt módon, közvetlen interakció révén okozó vegyületekkel (carmustin, ciszplatin) ellentétben a topoizomeráz inhibitorok (doxorubicin, camptotecin) közvetett módon, enzimfehérjék működésén keresztül károsítják a DNS-t. A

DNS-sel komplexet képező topoizomeráz I és II enzimek gátlása dupla szálú DNS törések létrejöttéhez vezet a replikációs vagy transzkripciós folyamatok során. Ilyen módon tehát sejtes rezisztenciához vezethet a célfehérjék alacsonyabb mértékű kifejeződése, a gátlószer affinitását csökkentő mutációk megjelenése, másrészt a DNS károsodást javító homológ rekombinációs és „non-homologous-end-joining” mechanizmusok fokozott működése is [50].

Az örökítőanyag javítását és a sejtciklus ellenőrző pontjait egyszerre aktiváló ún. „DNA damage response” (DDR) rendszer működésének növekedése különféle típusú DNS károsodások esetén is résztvehet a tumorsejtek rezisztens fenotípusának kialakításában. Az O<sup>6</sup>-metilguanin adduktok (carmustin) és egyéb kovalens bázismódosulások fokozott javításában az O<sup>6</sup>-metilguanin-metiltranszferáz (MGMT) [51] és a „base excision repair” javítórendszer tagjaként az AP endonukleáz-1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease-1) megnövekedett expressziója játszik fontos szerepet [52]. A DNS keresztkötéseket javító „nucleotide excision repair” és a nukleozid analógok által okozott hibákat javító „mismatch repair” rendszer túlműködése szintén csökkentheti a tumorsejtek érzékenységet a DNS-t károsító terapeutikumokkal szemben.

### **1.2.2.3 A sejtciklus gátlását és az apoptózis végrehajtását akadályozó rezisztencia mechanizmusok**

A terápiás szerek célfehérjéinek sikeres gátlása esetén, a fent említett intracelluláris rezisztencia mechanizmusok hiányában, a tumorsejtek osztódása leáll, és a sejt apoptotizál.

Mivel a DNS károsodása esetén a sejtnövekedést és DNS replikációt támogató enzimek, a jelátvitel, a citoszkeleton rendszer működőképes, a sejtosztódás bizonyos DNS sérülések esetén, azok ellenére is megtörténhet. A DNS károsodást észlelő fehérjétől a sejtciklust közvetlenül szabályozó ciklin-CDK (ciklin dependens kináz) komplexekig futó jelátvitel deregulációja, mely a sejtciklus megállítását gátolja, az intracelluláris rezisztencia mechanizmusok közé tartozik. A jelpályák hibás működése sok esetben tumorszupresszor fehérjék funkciójának hiányán alapul, tehát a védettséget megalapozó molekuláris változások az onkogenezis során alakulnak ki, hozzájárulnak a malignáns fenotípushoz (intrinsic resistance) [14, 24].

A sejtosztódást kontroll alatt tartó p53 transzkripciós faktor egyben az apoptózis és a DNS javítás folyamatainak is mesterregulátora. A fehérje megközelítőleg a tumorsejtek 50%-ban már az onkogenezis során inaktíválódik, és a toxikus kemoterápia is gyakran

kiváltja a tumorszupresszor funkciójának elvesztését [53], számos különböző kemoterapeutikummal szemben is csökkentve a terápiás válasz gyakoriságát. A transzkripciós faktor diszfunkciója a DNS-kötő domént érintő „loss of function” mutációk, vagy éppen ellenkezőleg, a túlélést és a proliferációt stimuláló teljesen új p53 funkciók megjelenését eredményező „gain of function” mutációk (pl. az EGFR, C-Myc transzkripciós aktiválása) következtében is létrejöhet [54]. Ugyanilyen hatása van a vad típusú p53 esetében a fehérjeszintet csökkentő fokozott proteaszómás degradációnak, illetve a fehérjét aktiváló foszforiláció hiányának, melyet többek között az Mdm2 ubiquitin ligáz megnövekedett ill. az ATM kináz csökkent funkciója okozhat [55]. A pro-apoptotikus és anti-proliferációs jelpályák hiányában a tumorsejtek a károsodott genetikai anyaggal túlélhetnek ill. továbbosztódhatnak, kikerülve a toxikumok sejtpusztító hatását.

A kemoterapeutikumok toxikus hatásának végső célja a sejtpusztítás, mely elsősorban az apoptózis folyamatának végrehajtását jelenti. Az irányított sejthalál az anti- és pro-apoptotikus jelátvitel egyensúlyának felborulásával következik be, ezért ezen folyamatok bármelyikét befolyásolva kialakulhat apoptotikus rezisztencia.

A tumorsejtekben az onkogének működése révén stimulált proliferációs jelátvitel a túlélési jelpályák aktivitását is növeli. Az ilyen módon stimulált PI3K/Akt/mTOR útvonalnak fontos szerepe van bizonyos pro-apoptotikus fehérjék (Bad, caspase 9) gátlásában, ami a túlélést támogatja [56]. A Bcl-2 fehérje családba tartozó pro-apoptotikus faktorok (Bax, Bad, Bak, BIM) génjeiben fellépő inaktiváló mutációk hasonló hatásúak. Ellentétes folyamatként az anti-apoptotikus (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, IAPs, FLIP) proteinek aktivitásának növekedése is csökkentheti a sejtek kemoterápiára adott válaszát [57], gyakran már az onkogenezis során aktiválódó NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor működésén keresztül [58].

A kemoterápiás szerek toxikus hatását csökkentő, eddigiekben ismertetett molekuláris mechanizmusok sokfélesége a sejt életét fenntartó folyamatok komplexitását és a tumorsejt ill. a tumorsejtpopuláció rendkívüli alkalmazkodó-képességét tükrözi, valószínűsítve, hogy a rezisztencia mögött az egyetlen sejt szintjén sem egy, hanem több mechanizmus kombinációja áll, annak ellenére, hogy némelyik kiemelt jelentőséggel bírhat. A sejt első védelmi vonalán, a sejtmembránban megjelenő multidrog transzporter fehérjék működése ilyen, kiemelt mechanizmusnak bizonyult, az általuk okozott rendkívül széleskörű védettség és ennek a klinikumban, több rákbetegség esetében is megfigyelt gyógyulást befolyásoló jelentősége miatt.



## 1.3 Multidrog rezisztencia

### 1.3.1 A multidrog rezisztens sejtfenotípus

A kemoterápiás rezisztencia *in vitro* modellezésére az 1970-es évektől egyre több rezisztens emlős sejtvonalat állítottak elő, a kezdetben érzékeny sejteket egy adott terápiás szer jelenlétében tenyésztve. A toxikus szer koncentrációjának lassú, fokozatos emelése mellett az érzékeny (parentális) sejtvonalakból sokszor több százszoros rezisztenciát mutató alvonalakat nyertek, a nagyobb ellenállóképességű sejtklónok lassú kisselektálásával [59]. A rezisztencia mechanizmusainak kutatására a modellsejtvonalak előállítása ma is ilyen módon, szelekcióval történik.

Az adott kemoterapeutikumra rezisztens sejtvonalak érzékenységi profiljának jellemzése nagyszámú, ismert vagy ismeretlen hatásmechanizmusú, hasonló vagy eltérő kémiai szerkezetű terápiás szerrel szemben, arra az általános megfigyelésre vezetett, hogy egy terapeutikummal szemben kialakuló rezisztencia egyidejűleg nagyon gyakran más hatóanyagok toxikus hatása ellen is védettséget jelent (kereszt-rezisztencia jelensége).

Számos olyan vegyületepárt azonosítottak, melyek esetében a rezisztens sejtvonalak kölcsönösen kereszt-rezisztenciát mutattak egymás toxikus hatásával szemben, ami felvetette a sejtek védettségét biztosító molekuláris mechanizmusok azonosságát. Biedler a klinikumban gyakran alkalmazott, két eltérő hatásmechanizmusú terápiás szer, a daunomycin (antraciklin) és a vinblasztin (vinka alkaloid) között bizonyított ilyen kapcsolatot. Különböző mértékben rezisztens hörcsög tüdősejt alvonalak előállításával igazolta, hogy a kétféle szerrel szemben kialakuló rezisztencia mértéke korrelál egymással [60]. Dano kiterjesztette a megfigyelést az egymástól molekuláris szerkezetüket tekintve is igen eltérő antraciklinek és vinka alkaloidok vegyületcsoportjaira. Emellett igazolta a rezisztens sejtek csökkent daunomycin felvételét, ami felvetette a plazmamembrán szerepét a rezisztencia kialakításában. Kísérleteiből, melyek a plazmamembránban zajló, energiát igénylő molekuláris folyamatra utaltak, arra következtetett, hogy a rezisztencia mechanizmusa egy, az extracelluláris tér felé irányuló, aktív transzportfolyamat [61].

Néhány évvel később Juliano igazolta egy körülbelül 170 kDa méretű glikoprotein megjelenését a colchicine rezisztens CHO (Chinese hamster ovary) sejtek felszínén, melynek mennyisége korrelációt mutatott a sejtes rezisztencia mértékével [62]. A hatóanyagok membrán permeabilitását befolyásoló, Juliano és mtsi által azonosított „P”-glikoprotein (P, permeability) [63] kifejeződését később antraciklin- és vinca alkaloid-rezisztens egér és humán sejtvonalakon is leírták. A humán P-glikoproteint kódoló DNS

szekvencia azonosítása után [64] exogén expresszióval is igazolták a fehérje szerepét a sejtek széles spektrumú rezisztens fenotípusának kialakításában.

A P-glikoprotein később részleteiben is megismert működése a legszélesebb spektrumú védettség, az ún. multidrog rezisztencia (MDR, multiple drug resistance) kialakításáért felelős. A nagyszámú, különböző hatásmechanizmusú és kémiai struktúráját tekintve igen eltérő vegyület toxicitásával szemben biztosított egyidejű védettséget széles szubsztrátspecifitású transzporterek, többek között a P-gp efflux funkciója biztosítja. A plazmamembránban kifejeződő ún. multidrog transzporterek a sejtbe jutó kemoterapeutikum extracelluláris térbe való kipumpálásával csökkentik a vegyületek intracelluláris koncentrációját, ennek következtében azok citotoxikus hatását.

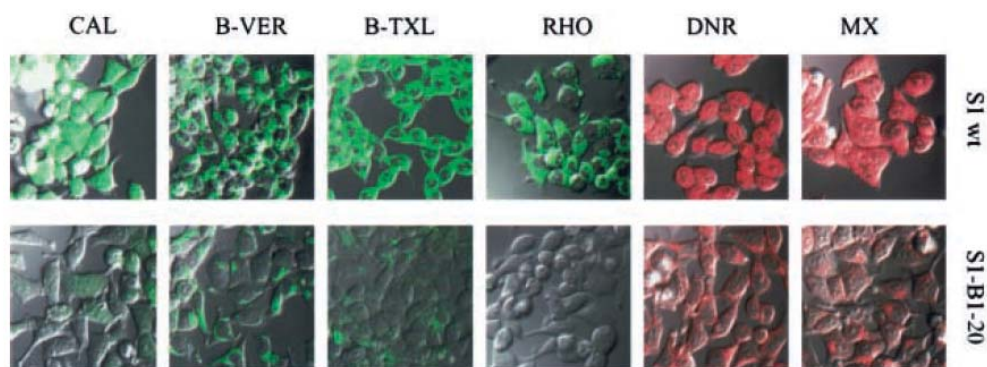
Az egyetlen fehérje kifejeződése és működése által biztosított széles spektrumú multidrog rezisztencia a prokariótáktól kezdődően az egész élővilágban jelenlévő általános, sejtvesztés védelmét biztosító mechanizmus, melynek jelentősége a rákellenes terápián kívül az antivirális, antimikrobiális és egyéb gyógyszerrezisztenciák esetében is kiemelt [65].

### **1.3.2 A humán multidrog transzporterek**

Az elsőként azonosított multidrog transzporter, a P-glikoprotein leírása után két másik, szintén a plazmamembránban kifejeződő fehérjét azonosítottak kemoterápiás rezisztenciát modellező humán sejtvonalakon.

A 190 kDa-os MRP1 (multidrug resistance associated protein 1) fehérjét kódoló cDNS-t adriamycin-rezisztens, nem kissejtes tüdőrák sejtekből izolálták [66], míg a kisebb méretű (72 kDa) transzportert, az MXR-t (mitoxantrone resistance protein) három kutatócsoport egymástól függetlenül írta le rezisztens vastagbélrák és mellrák sejtvonalakban (BCRP, breast cancer resistance protein) ill. a humán placentában (ABCP, placental ABC protein) [67-69].

A különböző kemoterápiás szerekekkel szemben rezisztens sejtvonalak plazmamembránjában igen sok esetben megfigyelhető az MRP1 és az ABCG2 megnövekedett expressziója, leggyakoribb azonban legszélesebb szubsztrát-specifitással rendelkező P-glikoprotein kifejeződése. A multidrog transzporterek efflux-funkciójához az energiát az ATP hidrolízise biztosítja. Az extracelluláris irányú transzportfolyamat által létrehozott csökkent intracelluláris drog-akkumuláció a transzporterek fluoreszcens tulajdonságú szubsztrát molekuláinak alkalmazásával mikroszkópos megfigyeléssel is detektálható (1. ábra).

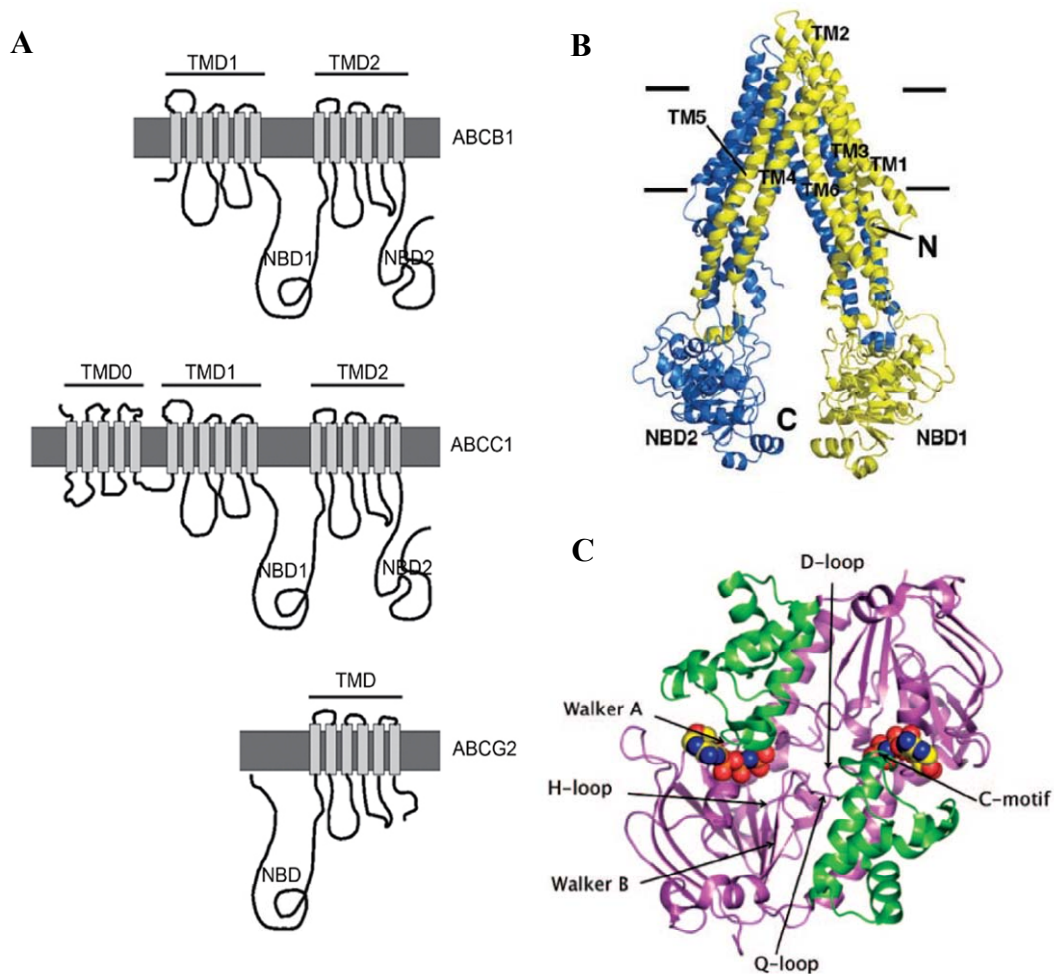


**1. ábra:** Az ABCB1/ P-glikoprotein overexpressziója által okozott csökkent drog-akkumuláció multidrog rezisztens S1-B1-20 vastagbél karcinóma sejtekben. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek fluoreszcens ABCB1/P-glikoprotein szubsztrátok steady-state akkumulációját ábrázolják parentális, drog érzékeny (S1 wt) és P-glikoproteint kifejező, biszantrén szelekcióval létrehozott S1-B1-20 sejtekben, 60 perces, 37°C-on történő inkubáció után. Mitoxantron (MX), daunorubicin (DNR), rhodamine 123 (RHO), BODIPY FL-paclitaxel (B-TXL), BODIPY-verapamil (B-VER), Calcein-AM (CAL). (Litman et al. (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. Cell. Mol. Life Sci. 58, 931–959; 6.ábra módosítva)

A multidrog transzporterek jellegzetes, körülbelül 215 aminosavból álló, konzervált ún. „ATP-binding cassette” (ABC) [70] doménjük alapján az ABC fehérjék szupercsaládjába tartoznak. Az ABC vagy más néven nukleotid-kötő doménben egy glicinben gazdag ún. „Walker A” és egy hidrofób ún. „Walker B” peptidmotívum található [71], melyek az ATP molekula megkötésében vesznek részt és általánosan jellemzőek a nukleotidokat kötő fehérjék szerkezetére (2. ábra). A két motívum között található ún. „ABC signature” motívum ezzel szemben az ABC fehérjecsaládra specifikus. A nukleotid kötő doménekhez (NBD, nucleotide binding domain) a membránt  $\alpha$ -helikális szerkezetű peptidláncokkal többszörösen átívelő transzmembrán domének kapcsolódnak (TMD), melyek a szubsztrátmolekulák megkötését és az extracelluláris tér felé való mozgatását végzik. A tipikus TMD 6 transzmembrán hélixet tartalmaz. A transzporterek működési egységéhez minden esetben minimum két NBD és TMD domén szükséges, melyek a P-glikoprotein és az MRP1 esetében egyetlen polipeptidláncon kódoltak („full transporters”), míg az egy NBD és egy TMD domént hordozó ún. féltranszporterek (pl. MXR) esetében a 4 domén a fehérje homodimerizációja révén

kapcsolódik egymáshoz. Az MRP1 transzporter a 4 említett doménen kívül tartalmaz egy N-terminálisan elhelyezkedő, 5 transzmembrán hélixből felépülő ún. TMD0 domént is. A transzmembrán domének ill. a két nukleotid kötő domén a plazmamembránban egységet alkotva közösen alakítja ki a transzporter szubsztrát kötő zsebét, ill. a két ATP kötő helyet tartalmazó, hidrolízist végző funkcionális egységet (2. ábra).

A nukleotid kötő domének szekvencia-elemzése alapján a 48 humán ABC fehérjét 7 alcsaládba sorolták, köztük az említett három multidrog transzporterrel, melyek az ABCB1 (P-glikoprotein), az ABCC1 (MRP1) és az ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) neveket kapták. A három transzporter szerkezeti felépítését a 2. ábra mutatja. Az ABC fehérjék között a transzportereken kívül membránsatornát (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), az antigén prezentációban szerepet játszó membránfehérjéket (TAP1/TAP2, transporter associated with antigen processing) is találunk [72]. A fent említett, kiemelt jelentőségű multidrog transzportereken kívül több további ABC transzporter rezisztenciát biztosító szerepét is megvizsgálták. Összesen további 15 transzporter esetében (ABCC2-6, ABCC10-11, ABCB2-6, ABCA2-3) figyelték meg a többek között vinca alkaloidok, antraciklinek, nukleotid analógok toxikus hatásával szemben csökkent érzékenységet ezen transzporterek kifejeződése esetén [14].



**2. ábra: A multidrog transzporterek szerkezeti felépítése.** A) A három multidrog transzporter transzmembrán doménéből (TMD) és nukleotid-kötő doménéből (NBD) felépülő szerkezete [73], 1. ábra. B) Az ABC transzporterek tipikus, négy doménből szerveződő működési egysége a plazmamembránban. Az ábrán az egér *Abcb1b* kristályszerkezete látható ún. “inward facing” (az intracelluláris tér felé nyitott) konformációban. A sárga szín az N-terminális TMD és az NBD1, a kék szín a C-terminális TMD és az NBD2 doméneket jelöli. Hat transzmembrán hélix (TM1-6) ill. a fehérje N- és C-terminális vége szintén jelölve van (N ill. C). A transzporter pszeudoszimmetrikus felépítésű. (Aller et al. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science 323, 1718-1722. 1. ábra módosítva.) C) Az ABC transzporterek filogenetikusan konzervált, az ATP kötését és hidrolízisét végző, két nukleotid-kötő doménből felépülő ún. NBD dimere. Az ábra a bakteriális Sav1866 exporter NBD dimerének szerkezetét mutatja 2 kötött ATP molekulával. Az NBD monomerek felül, ill. alul helyezkednek el, mindegyikük egy lila színnel jelölt központi és egy zölddel jelölt helikális szubdoménre osztható. Az ATP molekulát kötő ún. nukleotid-kötő helyek az ellentétes oldali NBD-k központi és helikális szubdoménjeiből szerveződnek. A konzervált, ATP-t kötő Walker A motívum, a Walker B és C-motívumok (“ABC signature”), továbbá a H-, D-, és Q-hurkok (loop) szintén jelölve vannak [74], 1. ábra.

Az ABCB1, ABCC1 és az ABCG2 farmakológiai szempontból fontos szubsztrátmolekuláit (köztük kemoterápiás szerek, antivirális, antimikrobiális gyógyszerek, antidepresszánsok) az 1. táblázat tartalmazza (a felsorolás nem teljes). A transzporterek nagymértékben átfedő szubsztrát-specifitással rendelkeznek. A célzott terápiás szerek közé tartozó tirozin kináz inhibitorok közül számos hatóanyag ABCB1 ill. ABCG2 transzporterekkel való interakcióját, szubsztrát tulajdonságát leírták. A 2. táblázat *in vitro* vizsgálatokon alapuló eredményeket összegezve szemlélteti, hogy a felsorolt tirozin kináz inhibitorok szubsztrát tulajdonsággal rendelkeznek.

Míg az ABCB1 inkább nagyméretű hidrofób, vagy pozitív töltésű molekulákat transzportál, az ABCC1 és az ABCG2 mind hidrofób, mind anionos vegyületeket, drogkonjugátumokat képes szubsztrátként felismerni [75]. Mindhárom fehérje kifejeződik az egészséges szervezet farmakológiai szempontból fontos határfelületein. Az ABCB1 a máj, vastag- és vékonybél, vese, here, vér-agy gát és placenta, míg az ABCC1 a tüdő, here, vese, placenta szöveteiben és a perifériális mononukleáris sejtek felszínén fejeződik ki [76]. Az ABCG2 szintén a vér-agy gáton, a placentában, a vastag- és vékonybélben, a májban és a szervezet szöveti összejtjein mutat endogén expressziót [76]. Mivel a transzporterek ezen határfelületeken efflux funkciójuk révén résztvesznek a szervezet ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) folyamataiban, az ún. kemoimmunitási hálózat részeként védelmet biztosítanak a szervezetbe jutó xenobiotikumok, mérgező endogén bomlástermékek toxikus hatásával szemben [75].

Pharmacologically relevant substances interacting with MDR1, MRP1 and ABCG2			
	MDR1	MRP1	ABCG2
Antiarrhythmics	Amiodarone, Lidocaine, Quinidine	Quinidine	
Antineoplastics			
Anthracyclines	Doxorubicin, Daunorubicin	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin	Mitoxantrone
Folate based		Methotrexate	Methotrexate
Kinase inhibitors	Imatinib (Gleevec)	Imatinib (Gleevec)	Imatinib (Gleevec), Flavopiridol
Plant alkaloids	Etoposide, Vincristine, Vinblastine, Topotecan	Etoposide, Vincristine, Vinblastine, Irinotecan, SN-38	Irinotecan, SN-38, Topotecan
Taxanes	Docetaxel, Paclitaxel, Ortataxel	Paclitaxel, Ortataxel	Ortataxel
Antidepressants	Desipramine, Trazadone		
Antivirals	Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir	Saquinavir, Ritonavir	Lopinavir, Nelfinavir, Delavirdine
Antibiotics and antifungals	Cefoperazone, Ceftriazone, Erythromycin, Itraconazole, Ketoconazole, Aureobasidin A	Difloxacin, Grepafloxacin	Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin
Antimalarials and antiparasites	Chloroquine, Emetine, Hydroxychloroquine, Quinacrine, Quinine	Chloroquine	
Calcium channel blockers	Bepridil, Diltiazem, Felodipine, Nifedipine, Nisoldipine, Nitrendipine, Tiapamil, Verapamil	Nifedipine	Nicardipine
Calmodulin antagonist	Chlorpromazine, Trifluoperazine		
Fluorescent dyes	BCECF-AM, Calcein-AM, Fluo-2, Fura-2, Rhodamine 123, Hoechst 33342	BCECF, Calcein, Fluo-3, SNARF	BCECF-AM, Hoechst 33342
Folates		Folic acid, L-leucovorin	Folic acid
Flavonoids	Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin	Quercetin, Kaempferol, Naringenin	Quercetin, Chrysin
Hormones	Aldosterone, Cortisol, Deoxycorticosterone, Progesterone Analogs, Testosterone	Sulfate or Glucuronide Conjugates of Estradiol and Estrone	Sulfate or Glucuronide Conjugates of Estradiol and Estrone
Metalloids		Sodium arsenite, Sodium arsenate, Potassium antimonite, Potassium, Antimony tartrate	
Immunosuppressants	Cyclosporin A, Cyclosporin H, Tacrolimus, Sirolimus	Cyclosporin A	Cyclosporin A
Peptides	Gramicidine D, Valinomycin	GSH, GSSG	
Toxicants		Aflatoxin B1, Methoxychlor, Fenitrothion, Chlorpropham	Aflatoxin B1

**1. táblázat: Az ABCB1/MDR1, az ABCC1/MRP1 és az ABCG2 transzporterekkel interakcióba lépő klinikai és toxikológiai szempontból fontos vegyületek.** (Szakacs et al. (2008) *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. *Drug Discov Today* 13, 379-393, 2. táblázat)



Inhibitor	Target molecule	Conclusion	P-gp/ABCB1/MDR1	ABCG2
Imatinib (Gleevec/STI-571)	c-Kit, PDGFR, Bcr-Abl	Substrate/inhibitor	[13,15,16,23,31,40,49-53]	[17,18,21,22,52,54,55]
		Inhibitor	–	[19,20]
nilotinib (AMN-107)	c-Kit, PDGFR, Bcr-Abl	Substrate/inhibitor	[56,57]	[18]
		Inhibitor	–	–
dasatinib (BMS-354825)	c-Kit, PDGFR, Bcr-Abl/Src kinases	Substrate/inhibitor	[53,58]	[58]
		Inhibitor	–	–
lapatinib (GW-572016)	EGFR	Substrate/inhibitor	[59,60,61]	[59,60,61]
		Inhibitor	–	–
sunitinib (SU-11248)	c-Kit, Flt-3, PDGFR, VEGFR	Substrate/inhibitor	[62]	[62]
		Inhibitor	–	–
INNO-406 (NS-187; CytRx Corp)	Bcr-Abl, Lyn	Substrate	[39]	–
		Inhibitor	–	–
gefitinib (Iressa/ZD-1839)	EGFR	Substrate/inhibitor	[55,63]	[17,26,27,55,63,64]
		Inhibitor	[65]	[66-68]
erlotinib (Tarceva/OSI-774)	EGFR	Substrate/inhibitor	[69]	[27,69]
		Inhibitor	[70]	[70, 71]

**2. táblázat: A protein kináz inhibitor rákellenes szerek és az ABCB1, ABCG2 transzporterek interakciói.** A közleményekben felhasznált kísérletes módszereket figyelembevéve soroltuk a vegyületeket a szubsztrát (kompetíciós gátlás) vagy a nem-kompetitív inhibitor kategóriákba. A táblázatban feltüntetett referenciák az összefoglaló cikk hivatkozásai. (Türk and Szakács (2009) *Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy. Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 246-252, 1. táblázat)

### 1.3.3 A humán ABCB1 multidrog transzporter

#### 1.3.3.1 Az ABCB1 kristályszerkezete és működése

Az ABCB1 multidrog transzporter 1280 aminosavból álló, 170 kDa molekulatömegű glikoprotein, mely a sejtek plazmamembránjában fejeződik ki és működik. Az ABC transzporterekre jellemző tipikus doménszerkezettel rendelkezik, két transzmembrán doménből és két nukleotid-kötő doménből épül fel (2. ábra).

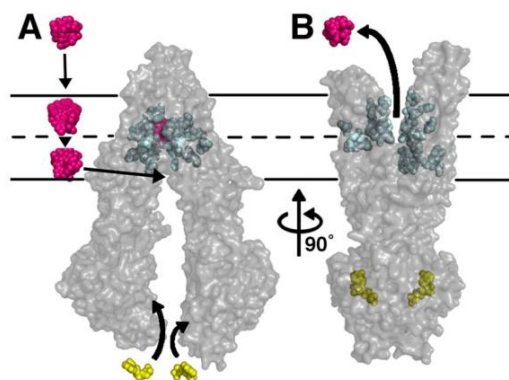
A transzporter koncentrációgradienssel szemben végzett efflux működéséhez az energiát az NBD dimer ATP hidrolizáló funkciója biztosítja. A plazmamembrán belső lipidrétegéből a transzporter hidrofób szubsztrátjait a külső lipidrétegbe ill. az extracelluláris térbe mozgatja. A bakteriális ABC transzporterek és az egér Abcb1 kristályszerkezeteinek szubsztrátok és nukleotidok jelenlétében vagy hiányában végzett elemzése az efflux transzporterek két különböző konformációs állapotát fedték fel. A szubsztrátmolekulák transzlokációja a transzporter intracelluláris tér felé nyitott (ún. „inward facing”) konformációs állapotából (3. ábra) az extracelluláris tér felé nyitott (ún. „outward facing”) konformációba való átmozdulás révén valósul meg [77]. A magas szubsztrátaffinitással rendelkező „inward facing” konformációban a szubsztrát belép a transzporter kötőzsebébe, amit az ATP molekula kötődése és az indukált



konformációváltozás követ. Mivel az „outward facing” konformáció alacsony szubsztrátaffinitású, a molekula elhagyja a kötőzsebet az extracelluláris tér felé. A transzportciklus során 2 ATP molekula hidrolizál. A transzporter katalitikus ciklusának pontos lépéseit, a ciklus során bekövetkező konformációváltozás és szubsztrátranszlokáció mechanizmusát itt nem részletezem.

Az ABCB1 rendkívül széles szubsztrát-specifitása egyedülálló a transzporterek között, mivel több száz, eltérő kémiai szerkezetű és méretű vegyület transzportjára képes. Aller és kollégái 2009-ben írták le a 87%-os szekvencia-homológiát mutató egér Abcb1 transzporter kristályszerkezetét 3,8 angstrom felbontásban, és közzétették elképzelésüket a polispécifikus droggötés molekuláris alapjairól. Modelljük két, a membrán belső lipidrétege és a citoplazma felé nyitott portált azonosított a fehérje nukleotidot nem kötő „inward facing” konformációs állapotában. A hélixek elhelyezkedése modelljük alapján kizárja a szubsztrátok kötőzsebbe való belépését a membrán külső lipidrétegéből, ill. az extracelluláris térből, viszont a két portál a transzportermolekula teljes szélességében csatornát biztosít a belső lipidrétegből való belépéshez. A transzporter transzmembrán-héliceiből szerveződő, igen nagyméretű kötőzseb, vagy belső üreg (internal cavity) főleg hidrofób és aromás aminosav oldalláncokkal borított, és a membrán magasságában helyezkedik el. A vizsgálatok szerint a kötőzsebben egyidejűleg két szubsztrátmolekula kötődése is megtörténhet. A hexapeptid inhibitor izomerekkel (QZ59-RRR ill. QZ59-SSS) való kristályosítás eredményei alapján a fehérje sztereoizomerek megkülönböztetésére is képes. Az izomerek a transzporter kötőzsebének különböző pontjain, eltérő orientációban és sztöchiometriával kötődtek. A QZ59-SSS izomer két molekulája és a QZ59-RRR izomer egyetlen molekulája összesen három eltérő kötőhelyet definiált a fehérje belső üregében [77]. Martinez és kollégái ennek a 3 új kötődési pontnak az előzőekben már prediktált H-, R-, és P- helyekkel való átfedését vizsgálták. A H-hely a Hoechst 33342 és a quercetin, az R-hely a rhodamine123 és a doxorubicin, a P-hely a prazozin feltételezett kötőhelyei. Kompetíciós transzportmérések alapján megállapították a QZ59-SSS helyek és a H-hely átfedését, mely az QZ59-RRR kötődési pontjától elkülönült [78].

Az itt felsorolt első eredmények fontos lépései a polispécifikus droggötés molekuláris szinten való megértésének, mely az ABCB1 széles szubsztrát-specifitásának alapja, azaz a klinikai multidrog rezisztencia molekuláris oka.



**3. ábra: A P-gp szubsztrát transzportjának modellje.** A) A szubsztrát (lila) az extracelluláris térből a membrán belső lipid rétegébe jut és egy nyitott portálon keresztül belép az internálisan elhelyezkedő szubsztrát-kötő zsebbe. A drogkötő zseb aminosavmaradékai (ciánkék gömbök) kölcsönhatásba lépnek a QZ59 molekulákkal és a verapamillal a transzporter ún. „inward facing” (intracelluláris tér felé nyitott) konformációs állapotában. B) Az ATP molekulák (sárga) az NBD doménekhez kötődve jelentős konformációváltozást okoznak, ami a szubsztrátot és a drogkötő zsebet a lipid-kettősréteg külső rétege ill. az extracelluláris tér felé mozditja. (Aller et al. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science 323, 1718-1722, 4. ábra)

### 1.3.3.2 Az ABCB1 transzporter jelentősége a klinikai multidrog rezisztenciában

Az *in vitro* MDR kialakulásáért igen nagyszámú rákellenes citosztatikum esetében az ABCB1 transzporter megnövekedett expressziója és funkciója felelős. A kismolekulás célzott terápiás szerek közül szintén többről bizonyított az ABCB1 szubsztrát tulajdonság [79]. A transzporter humán daganatokon és leukémiás sejteken való *in vivo* kifejeződését számos alkalommal vizsgálták, elemezve a betegek terápiára adott válasza, a progresszió mentes időszak, a teljes túlélés ill. a tumorokban mért ABCB1 expresszió között adódó összefüggéseket. Leukémiák (főképp akut mieloid leukémia), mellrák és kissejtes tüdőrák esetében számos vizsgálat mutatja a terápiás válasz arányának csökkenését a transzporter kifejeződése esetén [11, 12].

Az ABCB1 a mellrákos daganatok jelentős részében kifejeződik, az expresszió mértéke a kemoterápiát követően sok esetben magasabb, és gyakran korrelál a betegekben kiváltott csökkent terápiás válasszal egy 2005-ös meta-analízis összegzése szerint [80]. A 31 vizsgálatot, összesen 1200 beteg adatait analizáló elemzés a tumorok 41%-ában talált ABCB1 kifejeződést, és a transzporter szubsztrát ágensekkel való kezelés az esetek 40%-ában indukálta az expressziót, azaz került át a beteg negatívból pozitív kategóriába, míg

nem-szubsztrátok esetében ez az érték mindössze 10% volt. A részleges válasz elmaradásának relatív kockázata átlagosan 3-szoros volt a P-gp pozitív tumorok esetében ill. 4-szeres, ha csak a kezelés utáni diagnosztika eredményeit tekintjük. Egy 2008-as elemzés 25 mellrákos beteg primer daganatán vizsgálta az ABCB1 kifejeződést mind génexpressziós, mind fehérje szinten, a kemoterápiás kezelés (doxorubicin vagy epirubicin) után és azt megelőzően, szignifikánsan hosszabb progresszió mentes ill. teljes túlélést megállapítva a fehérje hiánya esetén (55 versus 13 hónap ill. 57 versus 21 hónap) [81]. Egy real-time PCR analízisre támaszkodó vizsgálat 59 beteget magas és alacsony ABCB1 expressziós csoportokba osztva talált szignifikáns különbséget a válaszadási gyakoriság, ill. a progresszió-mentes időszak hosszát tekintve. Alacsony transzporter kifejeződés esetén a betegek 68%-a, magas expresszió esetén 17%-a reagált a terápiára. A progresszió-mentes időszak is jelentősen hosszabb volt az alacsony ABCB1 expressziójú tumoroknál [82].

Míg a transzporter kifejeződésének jelentősége nem kissejtes tüdőrákban vitatott [11, 13], addig kissejtes tüdőrákban szintén gyakori az ABCB1 jelenléte és az ezzel összefüggést mutató csökkent terápiás válasz [11]. Triller és mtsi áramlási citometriás analízissel 17 beteg biopsziás mintáiban vizsgálták az ABCB1 pozitív ráksejtpopuláció arányát antitestes jelöléssel ciszplatin/etopozid kemoterápiát megelőzően, majd relapszusban. Az ABCB1 expresszió negatívan korrelált a terápiára adott válasz gyakoriságával, ill. 5-ből 4 betegnél a kemoterápia indukálta a fehérje expresszióját [83]. Egy 61 beteget követő vizsgálat immunhisztokémiás festéssel detektálva a fehérje mennyiségét szignifikánsan magasabb válaszadási arányt állapított meg az ABCB1 negatív daganatok esetében (81% versus 39%) [84].

Több mellrákos és tüdőrákos betegeken végzett hasonló vizsgálat azonban nem talált statisztikailag szignifikáns összefüggést a kezelés hatékonysága és a transzporter jelenléte között [11]. Az eltérő ágenseket, gyakran kombinált kezeléseket alkalmazó terápiák során a tumorokat érő különböző citotoxikus stressz, és az akár többféle intracelluláris rezisztencia-mechanizmus egyidejű indukálódása miatt az ABCB1 expresszió mértéke és szerepe a kialakuló terápiás MDR-ban vizsgálatonként, személyenként is eltérő lehet. Az MRP1 multidrog transzporter szintén gyakori expressziója [2] a két fehérje nagymértékben átfedő szubsztrátspecifitása miatt tovább nehezíti az ABCB1 transzporter jelentőségének becslését. A transzporter expresszió meghatározásához alkalmazott módszerek sokfélesége, különböző érzékenysége, a mintakezelés és

feldolgozás eltérései szintén magyarázhatják a vizsgálatok konklúziói közötti eltéréseket [13]. Az ABCB1 klinikai MDR-ben betöltött szerepének megerősítésére több kísérlet is vizsgálta a transzporter funkcióját *in vivo*, olyan tumorok esetében, ahol a transzporter expressziója gyakori (mellrák, kissejtes tüdőrák). A radioaktív technécium atomot tartalmazó ABCB1 szubsztrát 99mTc-sestamibi, melyet többek között mellrák daganatok és áttétes limfoid nóduszok detektálására alkalmaznak, csökkent akkumulációt mutat a transzporter működése esetén, ami transzporter inhibitorral való gátlásnál megszűnik. Mivel a Tc-sestamibi az MRP1-nek is szubsztrátja, ABCB1 specifikus inhibitor alkalmazásával van lehetőség az ABCB1-mediált efflux kapacitás követésére [85].

Akut mieloid leukémia esetében a transzporter expresszió igen gyakori, az egyes vizsgálatok a betegminták minimum 25-33%-át detektálják pozitívnak, és egyértelműen mutatják az ABCB1 terápiás választ csökkentő nemkívánatos hatását [12]. Az áramlási citometriás vizsgálatra alkalmas AML blaszt sejteken a transzporter funkciója is mérhető, és korreláltatható a beteg kemoterápiára adott válaszával. Egy akut mieloid leukémiás betegek blasztos sejteit analizáló vizsgálat szignifikánsan alacsonyabb MDR transzporter funkciót (ABCB1 és ABCC1) mért a terápiára reagáló betegek között, és bizonyította a transzporter aktivitás terápiás választ prediktáló értékét [86].

#### **1.3.3.3 Az ABCB1 transzporter fiziológiás szerepe**

A bélnyálkahártya epitéliumának apikális felszínén, a májsejtek kanalikuláris membránjában, a vese proximális tubulus sejtjeinek apikális membránjában, a vér-agy és vér-here gát kapillárisainak endotéliumában és a placenta trophoblaszt sejtrétegében mért magas ABCB1 fehérje expresszió a szervezet xenobiotikumoktól és mérgező endogén bomlástermékektől való védelmét biztosító ún. kemoimmunitási hálózat része [75]. A többek között a multidrog transzporterek működésén alapuló sejtes védőháló gátolja a mérgező anyagok szervezetbe való felszívódását, a szövetek közötti eloszlást befolyásolva kulcsfontosságú szöveteket és sejteket (a magzat szervezete, agy, here, őssejtek) zár el a toxikus molekuláktól, és elősegíti a mérgező vegyületek szervezetből való eltávolítását.

Egérben a P-glikoprotein funkciójának hiánya nem toxikus környezetben mindkét transzporter gén (Mdr1a, Mdr1b) eltávolítása esetén sem letális hatású, az állatok fertilisek és kondíciójuk az egészségesnek megfelelő. Ivermectin, vinblastine expozíció esetén azonban megnövekedett érzékenységet mutatnak a vad típusú egerekhez képest [87]. Számos knock-out egéren végzett kísérlet erősítette meg a transzporter kiemelt farmakológiai szerepét a vér-agy gáton, ahol az Abcb1 szubsztrát gyógyszerek (morphine,

loperamide, stb) agyszövetben való felhalmozódása jelentősen megnövekedett és fokozott gyógyszerhatással járt együtt [88]. Az orálisan adagolt ABCB1 szubsztrátok (HIV proteáz gátlók [89], taxol [87], tacrolimus [90]) AUC értékekkel reprezentált biohasznosíthatósága hasonlóképpen megnőtt a transzporter funkció hiányában.

Az emberi szervezetben az ABCB1 szubsztrátokat és/vagy inhibitorokat együttesen alkalmazó gyógyszeres kezelések a drog-drog interakciókon keresztül számos esetben megnövelték vagy csökkentették a hatóanyagok AUC értékeit, toxikus mellékhatásokat okoztak [91]. Az ABCB1 szubsztrát digoxin (szívglikozid) AUC értéke több inhibitor (valpodar, cyclosporin) esetében is megnőtt a fokozottabb felszívódás és a gátolt biliáris és renális kiválasztás következményeként [92]. A vese transzplantációt kísérő immunszuppresszív terápia során a cyclosporin A (CSA) és az amlodipine együttes alkalmazása a CSA megnövekedett biohasznosulását okozta, ami a szer alacsony terápiás indexe miatt kockázatot jelent [93]. A rákterápiában adjuvánsan alkalmazott inhibitorok hatását a következő alfejezet mutatja be részletesen.

Mivel a klinikai tapasztalatok alapján a membrán transzporterek jelentős hatással vannak a gyógyszermolekulák farmakokinetikájára, biztonságosságára és hatásosságára, az International Transporter Consortium az amerikai gyógyszerhatósággal (FDA, Food and Drug Administration) összhangban irányelvet bocsátott ki 2010-ben („Transporter White Paper”, [94]) a klinikailag releváns, ADME folyamatokat befolyásoló, drog-drog interakciókban (DDI) résztvevő transzporterek vizsgálatára (köztük az ABCB1 és ABCG2 transzporterekkel), hogy a gyógyszerfejlesztés integráns részévé tegyék a DDI vizsgálatokat. A különböző hatóanyagok a transzporterek expressziós szintjének módosításán keresztül is befolyásolhatják a szubsztrát tulajdonságú gyógyszerek vérkoncentrációját. Az orbáncfű kivonat az intesztinális ABCB1 expressziójának indukálása révén jelentősen csökkenti a transzporter szubsztrátok felszívódását [95].

Az anya és magzata közötti barrier, mely az oxigén, szén-dioxid, a különböző tápanyagok és bomlástermékek irányított áramlását biztosítja, a placenta syncytiotrophoblast rétege. Az epitéliumsejtek apikális, maternális oldalának felszínén kifejeződő ABCB1 transzporter résztvesz a magzat toxikus anyagokkal szembeni védelmében [96, 97].

## 1.4 A multidrog rezisztencia megoldását célzó megközelítések

### 1.4.1 Transzporter funkció gátlása inhibitor vegyületekkel

Az ABCB1 transzportert overexpresszáló tumorsejteken végzett *in vitro* kísérletek eredményei szerint a transzporter funkciójának inhibitor molekulákkal való gátlása hatékony módja a drogrezisztencia megszüntetésének. A transzporter *in vivo* MDR-t kiváltó szerepére utaló klinikai adatok alapján számos klinikai vizsgálat indult, mely kemoterapeutikumokat és inhibitor vegyületeket együtt alkalmazott. A különböző mértékben specifikus inhibitorok hatásának vizsgálata azonban csak kis százalékban mutatta a kezelés megnövekedett hatékonyságát az inhibitor jelenlétében. A legtöbb klinikai vizsgálatot akut mieloid leukémiás, mellrákos és tüdőrákos betegeken végezték. Mivel az első vizsgálatokban alkalmazott inhibitorok már forgalomban lévő gyógyszerek közül kerültek ki, számos súlyos mellékhatás jelentkezett a kalcium csatorna blokkoló verapamil, az immunszuppresszáns ciklosporin A és a quinine alkalmazása esetében. A második (valspodar, VX710) és harmadik generációs (tariquidar, zosuquidar) gátlószerek fejlesztése az off-target hatások csökkentését és a transzporterrel való kölcsönhatás specifikusságának növelését célozta. A kemoterapeutikumok és inhibitorok között fellépő drog-drog interakciók szintén súlyos toxikus mellékhatást okoztak, mivel megnövelték a citosztatikumok biohasznosulását, ami több esetben a klinikai vizsgálatok leállításához vezetett, ill. az alkalmazott terápiás dózisok csökkentését tette szükségessé [13].

Két fázis II vizsgálat, melyet metasztatizáló mellrákos betegeken végeztek, nem találta a verapamil ill. a quinidine hatását szignifikánsnak a kontroll csoporthoz viszonyítva [98, 99]. Ezzel ellentétben, egy 99 betegen végzett fázis III vizsgálat szerint, ahol az 5-fluorouracil terápiát egészítették ki verapamil kezeléssel, az inhibitor a válaszadási arányt jelentősen, 11%-ról 27%-ra emelte [100] és a teljes túlélés átlagát 209 napról 323 napra növelte. Egy CAF (ciklofoszfamid-adriamicin-fluorouracil) terápiával kezelt, 221 betegen végzett fázis III vizsgálat szintén nem tudta a dofequidar szignifikáns kedvező hatását kimutatni a terápiás paramétereken [101].

Miközben a vizsgálatok eredményei az inhibitor vegyületek hatástalanságát jelezték, az elemzések számos vizsgálattervezési hibára és problémára mutattak rá. A beválasztási kritériumok nem vették figyelembe a ráksejtek ABCB1 expressziós szintjét, a transzporter funkciót befolyásoló genotípusát, és több esetben alacsony hatékonyságú dózisban kellett alkalmazni a gátlószereket a toxikus mellékhatások jelentkezése miatt [13].

#### 1.4.2 További megközelítések a multidrog rezisztencia kiküszöbölésére

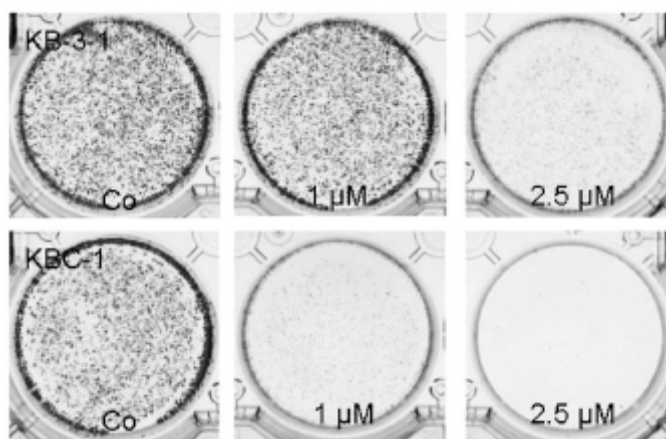
Az ABCB1 transzporter funkcionális gátlásán kívül számos további megközelítés is létezik a multidrog rezisztencia problémájának megoldására. Ide sorolható az a koncepció is, mely olyan hatóanyagmolekulákat tervez ill. azonosít, melyek nem szubsztrátjai az ABCB1 transzporternek. Számos újabb generációs mikrotubulus stabilizáló és destabilizáló ágens, ill. topoizomeráz I inhibitor fejlesztése és klinikai tesztelése zajlik, köztük a *Sorangium Cellulosum* baktérium eredetű epothilone vegyületekkel, melyek közül az ixabepilone alkalmazását az FDA 2007-ben engedélyezte metasztatikus vagy előrehaladott állapotú mellrák kezelésére, az antraciklin vagy taxán elsődleges terápiák sikertelensége esetén [102].

Szintén újabb megközelítés különböző típusú nanopartikulumok alkalmazása, melyek lehetnek liposzóma, vagy polimer alapúak, ill. baktériumsejt eredetű ún. minicellák, melyek feltölthetők az ABCB1 mRNS-ét targetáló antiszensz oligonukleotidokkal, siRNS-ekkel (small interfering RNA) ill. ABCB1 szubsztrát citosztatikumokkal. A nanorészecskék a sejtek plazmamembránján keresztül az ABCB1 efflux-funkcióját kikerülve juttatják be a hatóanyagokat ill. oligonukleotidokat az intracelluláris térbe [103]. Mivel az ABCB1 kifejeződésének szabályozásában a c-Myc transzkripciós faktor fontos szerepet játszik, *in vivo* kísérletek is történtek a c-Myc mRNS-ét targetáló siRNS-ek és a doxorubicin együttes, nanotechnológiával történő adminisztrációjára [104]. A nanopartikulumok kationos összetevőik révén egyrészt alkalmasak a negatív töltésű oligonukleotidok nagy affinitású kötésére, másrészt a felületükön specifikus targetáló molekulák is elhelyezhetők, mint például a folát receptorokhoz specifikusan kötődő folsav. A folát receptor több ráktípus esetében is (köztük a mellrák, tüdőrák, vastagbélrák) megnövekedett expressziót mutat. Ilyen módon a partikulumok tumorsejtekhez való célzott eljuttatása is lehetséges [103].

A mi megközelítésünk ezzel szemben radikálisan új, mivel az ABCB1 transzporter működésének eliminálása helyett a transzporter funkciójának kihasználása révén célozza az MDR sejtek pusztítását. A következő fejezetben a multidrog rezisztens sejtek által felkínált, kihasználható ún. drog-indukált túlérzékenység jelenségét mutatom be (kollaterális szenzitivitás).

## 1.5 A kollaterális szenzitivitás jelensége

Az ún. kollaterális szenzitivitás vagy kollaterális érzékenység a rezisztenciához szorosan kapcsolódó fogalom. Egy adott toxikus vegyülettel szemben rezisztenciát, védettséget mutató sejt ellentétes viselkedését, azaz túlérzékenységét írja le egy másik vegyület toxikus hatásával szemben. A túlérzékenység minden esetben, hasonlóan a rezisztencia definiálásához, egy, a parentális sejtek viselkedéséhez való viszonyítást jelent (4. ábra). A rezisztens tulajdonságot kísérő, tehát „kollaterális” érzékenység a rezisztens sejtek toxikus hatásra adott nem várt, szokatlan viselkedése, melynek jelentőségét az adhatja, hogy szelektív támadási lehetőséget kínál a rezisztens sejtek elpusztítására.



**4. ábra:** A multidrog rezisztens KB-C1 humán méhkarcinóma sejtvonal kollaterális érzékenysége a KP772 vegyülettel szemben. A mikroszkópos felvétel a KB-3-1 parentális karcinóma sejtvonalon és colchicine szelekcióval létrehozott multidrog rezisztens, ABCB1 transzportert overexpresszáló KB-C1 alvonalon végzett citotoxicitási teszt eredményét mutatja. 72 órás KP772 (Tris(1,10-phenanthroline)lanthanum(III)]trithiocyanate) vegyülettel történő inkubáció után láthatjuk a sötéten festődő élő sejtek mennyiségét a két sejtvonal esetében (felső sor: KB-3-1, alsó sor: KB-C1). 1 µM koncentrációnál a multidrog rezisztens sejtek parentális sejtekhez viszonyított csökkent száma a KB-C1 sejtek fokozott érzékenységét, azaz kollaterális szenzitivitását tükrözi. A kontroll (Co), azaz kezeletlen és a 2,5 µM-os kezelés a sejtvonalak egyforma viselkedését mutatja. (Heffeter et al. (2007) Multidrug-resistant cancer cells are preferential targets of the new antineoplastic lanthanum compound KP772 (FFC24). *Biochem Pharmacol* 73, 1873-1886, 1. ábra módosítva)

### 1.5.1 A kollaterális szenzitivitás a prokarióták és eukarióták körében

A rezisztens fenotípust „kísérő túlérzékenység” általános jelenség, számos prokarióta [105-108] és eukarióta faj esetében (egysejtű gombák, egysejtű paraziták, emlős sejtek) leírták [109-111]. Annak ellenére, hogy a jelenség a rezisztens sejtek támadhatóságát



bizonyítja, ezidáig nem vált külön kutatási területté, mindössze a rezisztencia-kutatások mellékjelenségeként tartották számon.

A „kollaterális szenzitivitás” kifejezést Szybalski és Bryson alkalmazta először rezisztens *Escherichia coli* törzsek kereszt-rezisztencia profilját leíró 1952-es közleményében [105]. Érdekes megfigyelésük szerint a bacitracin és kloromicetin antibiotikumokkal szemben rezisztens *E. coli* törzsek jelentősen megnövekedett érzékenységet mutattak két másik, egymással rokon kémiai szerkezetű antibiotikummal szemben (polymyxin B és cirkulin). A szerzők a megfigyelt túlérzékenységet a rezisztens fenotípust kialakító szelekciós folyamat következményeként magyarázták, feltételezve, hogy a folyamat egyidejűleg szelektálhatott egyéb, a rezisztenciát biztosító mechanizmushoz asszociált tulajdonságokra is, melyek megváltozása fokozhatta a polymyxin B és cirkulin toxikus hatását. A közleményfelvetette a kollaterális szenzitivitás antimikrobiális terápiában való felhasználásának lehetőségét is az antibiotikumok alkalmazási sorrendjének megállapításában, a rezisztencia problémájának megoldására.

A toxikus hatáshoz való adaptálódás, a rezisztens fenotípus kialakulása igen komplex, a sejtpopuláció szintjén zajló szelekciós folyamat, melynek során a sejtek számos intracelluláris változáson mehetnek keresztül, beleértve a fehérjék expressziós mintázatának, a sejtfal, a plazmamembrán összetételének, és a genetikai anyagnak a változásait is. Az antibakteriális, antimaláriás, gombaellenes és rákellenes kemoterápia rezisztencia-kutatásai a rezisztens fenotípusú sejteknek ezt a molekuláris szinten minden részletében megismerhetetlen, sokrétű átalakulását próbálták fenotípus szintjén jellemezni az 1950-70-es években [111]. A kémiai struktúráját és hatásmechanizmusát tekintve hasonló ill. eltérő kemoterápiás szerrekllek szemben vizsgált érzékenység feltérképezése mintegy „ujjlenyomatszerűen” képes a rezisztens sejtpopuláció jellemzésére, más sejtpopulációkkal való összehasonlítására, a fenotípus szintjén tükrözve a sejten belüli molekuláris változásokat.

Bech-Hansen és kollégái hörcsög CHO (Chinese hamster ovary) sejtvonalak jellemzése közben leírták a colchicine rezisztens sejtek többek között puromycinnel, daunomycinnel, gramicidin D-vel és adriamycinnel szemben mutatott kereszt-rezisztenciáját, és ezek mellett néhány szteroid hormonnal (xylocainedeoxycorticosterol, 1-dehydrotestosteron, 5-beta-pregnan-3,20-dione), anesztetikummal (xylocaine) és néhány Triton X detergenssel szemben megfigyelt kollaterális érzékenységet is. Több, eltérő colchicine-rezisztenciát mutató CHO sejtvonal vizsgálatával bizonyították, hogy a

sejtek pleiotróp válasza, azaz eltérő vegyületek hatására adott különböző típusú viselkedése (kereszt-rezisztencia, kollaterális szenzitivitás) korrelál a sejtek colchicine rezisztenciájának mértékével [111]. A szerzők feltételezése szerint a colchicinnel szembeni védetség és a mellé társuló túlérzékeny fenotípus ugyanannak az intracelluláris eltérésnek, véleményük szerint a sejtmembrán permeabilitását befolyásoló molekuláris változásnak a kifejeződése. Kutatócsoportjuk később azonosította a rezisztens CHO sejtek plazmamembránjában kifejeződő és a colchicine-védetségért felelős P-glikoproteint, a sejtek túlérzékenysége és a fehérje kifejeződése közötti összefüggés azonban ismeretlen maradt [112, 113].

Az antimaláriás szerekkel szemben kialakuló *Plasmodium* rezisztencia intenzíven kutatott területén szintén megfigyelték a kollaterális érzékenység jelenségét. A *Plasmodium falciparum* egysejtű parazita chloroquine rezisztenciájának kialakulásában a PfCRT (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) transzporter fehérje mutációi kulcsszerepet játszanak [114]. Johnson és kollégái 2004-ben megjelent közleményükben bizonyították többek között, hogy több chloroquine-rezisztens törzsből (Dd2, 7G8, J3D4) nyert különböző mutáns PfCRT haplotípusok esetében is amantadine túlérzékenység figyelhető meg [110]. Ezenkívül a két antimaláriás szer által kiváltott (chloroquine és amantadine) sejtválasz inverz jellegű kapcsolatát bizonyította az az eredményük, mely szerint a chloroquine rezisztens törzs több hetes amantadine szelekciója újraérzékenyíti a sejteket chloroquinnal szemben, az amantadine-rezisztens fenotípus megjelenése mellett.

Goffeau 2008-as Nature folyóiratban közölt áttekintésében [115] felhívja a figyelmet a gombás fertőzések leküzdésének súlyosbodó problémájára, melyet a patogén fajokban fellépő multidrog-rezisztencia okoz, visszautalva Rank és Bech-Hansen 1973-ban megjelent közleményére [109]. A publikációban a szerzők először bizonyították a nem patogén *Saccharomyces cerevisiae* egyetlen génlókuszt működéséhez köthető multidrog rezisztenciáját (MDR), azaz több, kémiaiilag eltérő vegyülettel szembeni egyidejű védetségét. Az oligomycin-rezisztens *S. cerevisiae* törzs 12 mitokondriális funkciót gátló vegyülettel szemben mutatott kereszt-rezisztencia profilja mellett a szerzők a sejtek 5 további inhibitorral kiváltott (paromomycin, neomycin, ethidium bromide, dequalinium chloride, acriflavin) kollaterális érzékenységét is leírták. A spontán revertáns, azaz multidrog-rezisztens fenotípusukat elvesztő sejtklónok egyidejűleg kollaterális

szenzitivitásukat is elvesztették, erősítve ezzel a fenotípusok közös gyökerének, az akár egyetlen gén mutációja által kiváltott pleiotróp viselkedésnek a hipotézisét [116].

Az antimikrobiális- és rákellenes kemoterápia rezisztencia-vizsgálataiban a rezisztens sejtek túlérzékenysége folyamatosan jelentkező fenotípus. A főképpen leíró jellegű eredmények a rezisztencia és a kollaterális érzékenység szoros összefüggésére, közös szelekciós eredetére utalnak. A rezisztenciát kialakító szelekciós folyamat több vagy akár egyetlen központi szerepet játszó faktor változásán keresztül alakíthatja ki a pleiotróp viselkedést. A kollaterális érzékenység mechanizmusának megértéséhez a továbblépést a részletes rezisztencia-mechanizmus kutatások adták, melyek sok esetben azonosították a rezisztenciáért felelős molekuláris változásokat, leggyakrabban fehérjék megváltozott expressziós szintjét, ill. funkciót befolyásoló mutációit.

### **1.5.2 Egyetlen fehérje megváltozott expressziója vagy mutációja által okozott kollaterális szenzitivitás az antimikrobiális kemoterápiában**

A humán P-glikoprotein funkciója által kiváltott multidrog-rezisztencia (MDR) [112] prokariótákra és eukariótákra közösen jellemző, általános rezisztencia-mechanizmust írt le [65], mely egyetlen transzporter fehérje működése révén számos toxikum intracelluláris akkumulációját képes egyidejűleg megakadályozni. Az alacsonyabb rendű szervezetekben azonosított, ortológ transzporterek multidrog rezisztenciát kiváltó szerepének igazolása közben a rezisztens sejtek kollaterális érzékenységét is megfigyelték.

Az azole-típusú gombaellenes szerekkel (pl. fluconazole) szembeni védettség kialakulásában a *Candida albicans* több transzporterfehérjéje is szerepet játszik (CDR1, CDR2, CaMDR1) [117]. Az ABC szupercsaládhoz tartozó CDR1 multidrog transzporter ill. a CaMDR1 transzporter (MF szupercsalád) nem patogén élesztő sejtekben való heterológ expressziója révén előállított azole-rezisztens törzseken Milewski és kollégái néhány újabb típusú gombaellenes oligopeptid toxikus hatását vizsgálta [118]. Két izogenikus, csak egyetlen fehérje expressziójában eltérő sejtvonal, vagy törzs modellrendszerként való alkalmazása bizonyíthatja, hogy egy adott sejtválasz valóban a vizsgált, kifejezett fehérjéhez köthető.

Milewski és kollégái számos azole-típusú citosztatikum esetében figyelték meg az élesztő törzsek rezisztenciáját, függetlenül attól, hogy a törzs a CDR1 vagy a CaMDR1 fehérjét expresszálta. Emellett azonban a CDR1 transzportert kifejező sejtek nem várt, fokozott érzékenységét találták az ún. FMDP-peptidekkel szemben (glükózamin-6-foszfát

szintáz inhibitorok, FMDP: methoxyfumaroyl-diaminopropanoic acid). A CDR1 fehérje expressziója által kiváltott „szuperérzékenységet” a szerzők a CDR1 jelenlétében mért megnövekedett peptidfelvételi sebességgel magyarázták, mely véleményük szerint magasabb intracelluláris FMDP-peptid koncentráción keresztül eredményezhet megnövekedett toxicitást. Bár a jelenség hatásmechanizmusa, a CDR1 transzporter pontos szerepe feltáratlan maradt, a heterológ transzporter expresszió bizonyítja, hogy mind az azole-rezisztenciát, mind a peptid-túlérzékenységet kiváltja a CDR1 transzporterfehérje kifejeződése [118].

Az *E. coli* egyik chloramphenicol-rezisztenciáért felelős multidrog-transzporteréről szintén leírták, hogy megnövekedett expressziója érzékenyíti a sejteket az antibiotikum spectinomycinnel szemben. Bohn és Buoloc a CmlA (Cmr/MdfA) multidrog-transzporter génjével transzformált *E. coli* törzs túlélését vizsgálta egy letális hatású fehérje jelenlétében, mikor a szelekciós antibiotikumként használt spectinomycin fokozott toxicitását észlelték [107]. A spectinomycin-érzékenységre fókuszáló további kísérletek végül megerősítették a CmlA transzporter overexpressziójához kapcsolódó kollaterális szenzitivitást, bár a pontos mechanizmus ismeretlen maradt.

Johnson és Fidock egy chloroquinre érzékeny *Plasmodium falciparum* törzsben az endogén, vad típusú pfert allél helyettesítésével bizonyította, hogy a mutáns transzporter kifejeződése egyszerre okoz chloroquine védettséget és amantadine túlérzékenységet több különböző mutáns haplotípus esetében is [110]. A szerzők elmélete szerint a mutáns PfCRT a malária emésztő vakuólumából (digestive vacuole) a chloroquint és az amantadint kijuttatva, előbbi eltávolítja ismert target molekulájától (hematin) [119], míg utóbbit felhalmozza a citoplazmában, ahol az amantadine feltételezett célmolekulája található.

A toxikus hatáshoz való adaptálódás, a rezisztens sejtpopuláció kialakulása közben a sejtek számos molekuláris tulajdonsága megváltozhat. A fenti izogenikus sejtekben, szelekciós folyamattól mentes körülmények között végzett transzporter-vizsgálatok azt igazolják, hogy a rezisztenciát és a kollaterális érzékenységet kiváltó faktor azonos, és egyetlen vad típusú vagy mutáns fehérje működéséhez köthető. A kollaterális érzékenység pontos mechanizmusait azonban ezekben az esetekben sem igazolták

### **1.5.3 Rezisztens tumorsejtek kollaterális érzékenysége**

A drogszelekcióval létrehozott rezisztens tumorsejtvonalak kollaterális érzékenysége a sejtvonalak eredetétől függetlenül gyakran megfigyelt jelenség, melyet számos

különböző toxikum által indukált rezisztens fenotípus esetében is leírtak [115, 120, 121], ám a kereszt-rezisztens fenotípusnál jelentősen ritkábban fordul elő [108].

Jensen és kollégáinak szisztematikus munkája, mely topoizomeráz inhibitorokra és alkilálószerekre rezisztens 7 tüdőráksejtvonal kereszt-rezisztencia profilját vizsgálta 19 toxikummal szemben, számos esetben tapasztalt túlérzékenységet. A 19-ből 14 vegyület váltotta ki valamelyik sejtvonal fokozott érzékenységét, ill. minden rezisztens sejtvonal legalább egy toxikumra kollaterálisan szenzitív volt. A túlérzékenység mintázata több esetben szoros összefüggést mutatott a vegyületek hatásmechanizmusával. Eredményeik igazolták a topoizomeráz I (TopoI) inhibitorokkal (camptotecin, topotecan) szemben rezisztens sejtek túlérzékenységét topoizomeráz II (TopoII) gátlószerekkel (doxorubicin, VM-26) való kezelés esetén [120]. A jelenség mechanizmusát is azonosították: mivel a topoizomeráz I gátlók DNS-szál törést okozó toxikus hatása korrelál a kifejezett TopoI mennyiségével, a camptotecin és topotecan rezisztencia gyakran az enzim csökkent expressziójának következménye [122]. Ez esetben a kiesett enzimműködést a hasonló funkciójú TopoII helyettesíti, ami miatt sejt érzékenyebb utóbbi enzim gátlására [120].

Az alkiláló szerekre rezisztens sejtvonalak TopoII inhibitorokkal kiváltott fokozott érzékenysége mögött hasonló mechanizmus áll, melyet több további kutatás is vizsgált, leírva a fenotípust nitrogén mustár és melfalán esetében is. Az eredmények szerint megnövekedett TopoII aktivitást, mely érzékenyíti a sejteket a TopoII gátlószerekre, a szerzők az enzim DNS károsodás javításában betöltött egyelőre csak feltételezett szerepével magyarázták [72, 123].

Poruchynsky és kollégáinak munkája [121] a mikrotubulus polimerizációt ill. depolimerizációt indukáló toxikumok hatását elemzi ovárium karcinóma sejteken. A mikrotubulosok épülését gátló (depolimerizációt okozó) HTI-286 vegyületre rezisztens sejtek fokozott érzékenységét mutatja be az ellentétes mechanizmusú (tubulin polimerizációt okozó) paclitaxel, docetaxel, sarcodyctin A vegyületek hatásával szemben. A rezisztencia és a túlérzékenység oka ugyanaz a molekuláris változás, a rezisztens sejtek  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -tubulin alegységeiben megjelenő stabilizáló hatású mutáció, mely a mikrotubulus épülés és bomlás egyensúlyát az előbbi felé eltolva gátolja a normál dinamikát. Paclitaxel rezisztens epidermoid karcinómasejteken a HTI-286 érzékenyítő hatását szintén leírták, megerősítve a stabilizáló mutációk szerepét [124].

A fenti esetekben ismertetett kollaterális érzékenységet magyarázó mechanizmusok azonosítása nagy jelentőségű előrelépés a jelenség terápiás felhasználása felé, mivel a

rezisztens sejtek szelektív támadhatósága itt pontosan ismert, diagnosztikailag követhető molekuláris változásokon alapulhat

#### **1.5.4 A multidrog rezisztens fenotípushoz köthető kollaterális érzékenység**

A multidrog rezisztenciát kiváltó MDR transzporterek (ABCB1, ABCC1, ABCG2) fokozott expresszióját a rákterápiában alkalmazott kemoterapeutikumok széles köre képes indukálni. Az *in vitro* leggyakrabban indukálódó ABCB1 transzporter szerepe kiemelt jelentőségű, mivel kifejeződése a klinikai adatok alapján is negatívan befolyásolja a terápiás válasz kialakulását (lásd. 1.3.3.2 alfejezet). Ezért a multidrog transzporterek expressziójához és működéséhez köthető túlérzékenység vizsgálata is kiemelt jelentőségű, mivel új megközelítést jelenthet az MDR sejtek eliminálására. Mivel az ABCG2 jelenlétéhez köthető kollaterális érzékenységről nincs elegendő számú megbízható tudományos eredmény, ezért először az ABCC1, majd az ABCB1 transzporterek szerepét tárgyalom.

##### **1.5.4.1 A multidrog transzporter ABCC1 kifejeződéséhez köthető kollaterális érzékenység**

A P-glikoproteinnel átfedő szubsztrátspecifitású ABCC1/MRP1 transzporter kifejeződése a tumorsejteken széles spektrumú multidrog rezisztenciát okoz. Fiziológiás működése során egyrészt xenobiotikumok extracelluláris irányú transzportját végzi a szervezet méregtelenítő folyamataiba kapcsolódva, másrészt endogén szubsztrátok (pl. leukotrién C4) membránokon át történő mozgatásáért is felelős [75].

A glutation (GSH) szintézist gátló butionin szulfoximin (BSO) által ABCC1 jelenlétében kiváltott fokozott toxicitást Rappa és kollégái közölték egy, a fehérje cDNS-ét kifejező transzfektált és parentális humán fibroszarkóma sejtvonal párt vizsgálva [125]. Megfigyeléseik szerint a transzportert expresszáló sejtek magasabb GSH szintézisének sebessége ellenére a GSH steady-state szintje ABCC1 kifejeződés esetén kezelés nélkül is alacsonyabb a parentális sejtekhez képest, ill. a BSO ezekben a sejtekben nagyobb mértékű GSH depléciót indukál. Mivel a GSH szintézisének sebesség-meghatározó lépése a  $\gamma$ -glutamil cisztein szintetáz (GCS) enzim működése, ezért a szerzők a GCS katalitikus alegységének és az ABCC1 transzporternek együttes transzfektálásával bizonyították, hogy a BSO kezelésre való túlérzékenység a GSH szintjének visszaállításával megszüntethető. Mivel a transzporter szubsztrátjait glükuronid, szulfát vagy glutation (GSH) konjugátum formájában, ill. GSH kotranszporttal távolítja el a

sejtekből, valamint a glutation az ABCC1 egyik endogén szubsztátja, a transzporter működése felelős a megfigyelt viselkedésért [75].

Hasonlóképpen, a kalcium csatorna blokkoló és ABCC1 inhibitor verapamil is a transzportert kifejező sejtek megnövekedett érzékenységét okozta. Trompier és mtsi egy funkcióképtelen K1333L mutáns ABCC1 fehérje vizsgálatával bizonyították, hogy a szelektív érzékenység a transzporter funkciójához köthető, azt a fehérje jelenléte önmagában nem váltja ki [126]. Eredményeik szerint a verapamil kezelés GSH depléciót okoz az MDR sejtekben. Membrán vezikuláris esszében vizsgálva a GSH felvételt kiderült, hogy a verapamil az ABCC1 glutation transzportjának stimulálásán keresztül okoz a sejtekben szelektív, transzporterfunkcióhoz kapcsolt GSH depléciót.

Laberge és kollégái megerősítették az eredményeket, és bizonyították, hogy a verapamil, BSO ill. az apigenin esetében is az MDR sejtek szelektív apoptózist a megnövekedett reaktív oxigén gyök (ROS, reactive oxygen species) mennyiség okozza [127].

#### **1.5.4.2 A multidrog transzporter ABCB1 kifejeződéséhez köthető kollaterális érzékenység**

A P-glikoprotein multidrog transzportert overexpresszáló MDR tumorsejtvonalakon leírt túlérzékenység mechanizmusa a legtöbb esetben egyelőre nem bizonyított. Azonban, mivel a rákellenes kemoterapeutikumok által leggyakrabban indukált rezisztencia mechanizmus a P-glikoprotein efflux funkciója, *in vitro* kísérletek alapján számos túlérzékeny viselkedés kapcsolható ezen transzporter jelenlétéhez [120, 128, 129], bizonyos esetekben bizonyítottan a fehérje működéséhez [130] [131].

A túlérzékenység egyik oka lehet az MDR sejtekbe bejutó nagyobb toxikum mennyiség, mint például a poliamin analóg N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-dietilnorspermin esetében, ahol ismert, hogy a hatóanyag plazmamembránon való átjutását egy transzportrendszer biztosítja. A három melanóma sejtvonal kétszeresére növekedett drogfelvétele és a plazmamembrán P-gp expressziója közötti okozati összefüggés azonban nem bizonyított, ezek a szelekciós folyamat során párhuzamosan jelentkező független változások is lehetnek [128]. Hasonlóan a H69/DAU MDR tüdőráksejtvonal gemcitabin és citozin-arabinozid túlérzékenysége [120, 132] sem kapcsolható közvetlenül a P-gp kifejeződéséhez. Az érzékenység oka valószínűleg a sejtekben detektált fokozott deoxicitidin-kináz működés, mely az aktív metabolitok MDR sejtekben mért magasabb felhalmozódását eredményezi [132]. Bár a szerzők későbbi munkájukban P-gp-vel

transzfectált sejtek magasabb érzékenységét is kimutatták, érdekes módon részletes vizsgálataikban csak a szelektált MDR sejtvonalakkal foglalkoztak [129].

Több megfigyelés a túlérzékenységet a plazmamembrán tulajdonságainak megváltozásán keresztül hozza összefüggésbe a P-glikoprotein magas expressziós szintjével. Bech-Hansen colchicine-rezisztens hörcsög sejtekben írt le korrelációt a Triton X detergensre való túlérzékenység és a transzporter által kiváltott rezisztencia mértéke, azaz a fehérje funkciója között. Emellett több, hidrofób tulajdonságában kismértékben eltérő Triton X analóg vizsgálatával mutatta meg, hogy a kollaterális érzékenység mértéke pozitívan korrelál a vegyületeknek ezzel a kémiai tulajdonságával. Az alacsonyabb hidrofóbicitási értékek megjelenésével először a túlérzékenység megszűnése, majd detergens-rezisztencia megjelenése volt megfigyelhető [111]. Később Loe munkája kiegészítette a megfigyeléseket azzal, hogy a túlérzékenységet nem a rezisztens sejtekben akkumulálódott nagyobb detergens (Triton X) mennyiség okozza, ill. egy további membrán-aktív rokon vegyület, a Nonidet P-40 hasonló viselkedését is leírta. Később mindkét vegyületről igazolódott, hogy direkt kölcsönhatásba lépnek az ABCB1 transzporterrel [133]. A Triton X-100 szubsztrátnak bizonyult, az analógok affinitása a láncszerűen elhelyezkedő etoxi csoportok számának növekedésével pozitív korrelációt mutatott [134], ami magyarázhatja Bech-Hansen korábbi megfigyelését, a hosszú láncoknál megjelenő Triton X rezisztenciát. A kollaterális érzékenység pontos mechanizmusa ismeretlen maradt.

A kalcium csatorna blokkoló és P-gp szubsztrát verapamil fokozott toxicitást kiváltó hatását, ebben a transzporterfunkció alapvető szerepét több csoport is leírta. Első bizonyítékként multidrog rezisztenciájukat elvesztő hörcsög sejteken figyelték meg a túlérzékenység párhuzamos elvesztését [135]. A további kísérletek a kollaterális érzékenységet a transzporter verapamil által stimulált megnövekedett ATP-áz aktivitásával magyarázták. A verapamil által kiváltott apoptózis és ATP-áz aktivitás a koncentráció függvényében kétfázisúnak mutatkozott, kisebb koncentrációnál fokozottabb transzporter működést és párhuzamosan nagyobb sejthalált okozva, míg nagyobb koncentrációnál az ATP-áz aktivitás csökkenését alacsonyabb mértékű apoptózis kísérte. A mérések a kisebb koncentrációnál megnövekedett szuperoxid és csökkent glutation tartalmat mutattak, mely különbségeket a túlérzékenységgel együtt a P-gp specifikus gátlószere, a PSC833 eltüntette. A szerzők szerint a kollaterális érzékenységet a verapamil és a P-gp együttes jelenlétében a sejtanyagcsere fokozott



működése során melléktermékként keletkező reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species, ROS) sejtkárosító hatása okozza, mely a transzporter által fogyasztott ATP mennyiség pótlására indukálódik [130]. Laberge és kollégáinak eredményei siRNS mediált P-gp csendesítéssel megerősítették a transzporter-függő túlérzékenységet. Hasonló hipotézisüket két mitokondriális elektrontranszportlánc-gátlószer, a rotenon és az antimycin A túlérzékenységet kiváltó hatásával támasztották alá, melyek ROS képződést indukáló hatása ismert [136].

A P-gp expresszió és a sejtek energiametabolizmusa közötti szoros összefüggésre utal több adriamycinnel szelektált humán mellrák és méhkarcinóma sejtvonal megnövekedett intracelluláris ATP szintje, amit további szerzők is leírtak [132, 137]. Kaplan és mtsi szerint a magasabb ATP mennyiség az MDR sejtek megnövekedett energiaigényét tükrözi. Elképzelésük szerint az energia-termelő folyamatok gátlása megoldás lehet a rezisztencia kiküszöbölésére. Munkájukban a deoxi-D-glükóz glikolízis inhibitor által kiváltott fokozott toxicitását és ennek P-gp expressziótól való függését bizonyították többek között a transzporter cDNS-ével transzfektált sejtvonalakon. A P-glikoproteint kifejező MDR sejtekben leírt, exogén szubsztátok hiányában is tapasztalt megnövekedett glikolízis sebesség és laktát termelés [138] alátámaszthatja a feltételezést [137]. Egy másik csoport eredményei szerint a deoxi-D-glükóz fokozott toxicitása az általuk vizsgált MDR méhkarcinóma sejteken a plazmamembrán csökkent GLUT-1 glükóz transzporter expressziójával volt magyarázható, ami a glükóz felvétel korlátozásával érzékenyíthette az MDR sejteket. Az ABCB1 expresszió és a GLUT-1 transzporter expressziós szintjének csökkenése közötti okozati összefüggést nem igazolták [139].

A Triton X detergenshez hasonló felépítésű, etoxi és propoxi csoportokat láncszerűen tartalmazó Pluronic polimerek érzékenyítő hatását is leírták az MDR transzporter jelenlétében. A vegyület az MDR sejtekben szelektív ATP-szint csökkenést okozott, amit a szerzők szintén a P-gp funkciójából következő nagyobb energiaszükséglettel hoztak összefüggésbe [140].

#### **1.5.4.3 A tioszemikarbazon NSC73306 által kiváltott ABCB1 funkció-függő kollaterális érzékenység**

Az eddigiekben tárgyalt kollaterális érzékenységet kiváltó ágensek a rezisztens sejtek kereszt-rezisztencia profilját kutató citotoxicitási mérések eredményeiből „véletlen” megfigyeléseken keresztül kerültek azonosításra. A szelekcióval létrehozott rezisztens sejtek és a parentális sejtvonalak molekuláris eltéréseinek bonyolult sokfélesége miatt a

kollaterális szenzitivitás igazolása, illetve jól meghatározott rezisztencia-mechanizmushoz való kapcsolása csak néhány esetben volt sikeres [124, 125, 130]. Sok esetben csak a jelenség leírására került sor, annak ellenére, hogy a szerzők a túlérzékenység sejtbioológiai szempontból való érdekességét és rezisztencia-kutatás szempontjából való jelentőségét kiemelték.

Szakács és kollégáinak munkája, mely szisztematikus *in silico* megközelítésből kiindulva azonosított ABC transzporter szubsztrátokat a Developmental Therapeutics Program (DTP) vegyülettárából (az ABCC2, ABCC11, ABCB1 esetében), egy olyan vegyületet is leírt, mely fokozott toxikus hatást mutatott az ABCB1 transzporter jelenlétében [141]. A tioszemikarbazon NSC73306-ról a szerzők igazolták, hogy a vegyület az ABCB1 kifejeződése esetén az MDR sejtek túlérzékenységét váltja ki, melynek mértéke korrelál az ABCB1 expressziós szintjével. Utóbbi megfigyelést siRNS-mediált csendesítéssel is igazolták. Az NSC73306 fokozott aktivitása továbbá a transzporter specifikus inhibitoraival gátolható volt [131].

Az NSC73306 az első DTP-ből azonosított vegyület, melynek kollaterális érzékenységet kiváltó hatása bizonyítottan az ABCB1 működéséhez köthető. Mivel a sejtek multidrog rezisztenciáját és túlérzékenységét ugyanaz a faktorhoz, az ABCB1 transzporter váltja ki, az NSC73306 és a hasonló tulajdonságú vegyületek alkalmasak lehetnek az MDR sejtek szelektívpusztítására, ami akár egy új terápiás megközelítést is jelenthet a rezisztencia problémájának megoldására.

## **1.6 A National Cancer Institute Developmental Therapeutics Programja és az NCI-60 tumorsejtpanel**

A National Cancer Institute által létrehozott Developmental Therapeutics Program (DTP) elsősorban hatékony rákellenes szerek azonosítására és a már forgalomban lévő kemoterápiás szerek továbbfejlesztésére alakult. 2002-es adatok szerint az Amerikai Egyesült Államokban forgalomba hozott rákellenes szerek 40%-ának esetében a DTP részt vett a hatóanyagok felfedezésében ill. vizsgálataiban. A DTP több 100 ezer vegyületből álló könyvtára szintetikus és természetes eredetű, feltételezett rákellenes hatással rendelkező molekulákat tartalmaz, melyek belföldi és külföldi, akadémiai és piaci forrásokból származnak. 1990 óta a program *in vitro* citotoxicitási teszteket végez a molekulák toxikus aktivitásának jellemzésére a 60 humán tumorsejtből álló NCI-60 sejtpanelen, miközben újabb vegyületeket fogad be és szintetizál. A sok ezer vegyület *in*

*vitro* analízisének eredményei nyilvánosak, a könyvtár molekulái pedig ingyenesen hozzáférhetőek a kutatócsoportok számára [142].

A NCI-60 sejtpanel 60 különböző humán tumorsejtvonalat tartalmaz, melyek között leukémia, melanóma, petefészek-, tüdő-, vastagbél-, vese-, prosztatata-, mellrák sejtvonalak és központi idegrendszer eredetű tumorsejtvonalak találhatók. A sejtvonalak jól karakterizált, megbízható eredetük alapján megfelelően reprezentálják az adott betegségeket [143]. A tumorsejtpanel mRNS, DNS, fehérje szinten és funkcionálisan, drogérzékenység alapján is jól jellemzett. A sejtvonalak génexpressziós mintázata jól tükrözi szöveti eredetüket is. Az NCI-60 panelen mért toxicitási mintázatok összehasonlításával már számos esetben azonosították vegyületek ismeretlen hatásmechanizmusait [144].

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Doktori kutatómunkám során az ABCB1 transzportert kifejező multidrog rezisztens (MDR) tumorsejtek célzott pusztítására alkalmas vegyületek azonosításával és *in vitro* vizsgálatával foglalkoztam, céljaim a következők voltak:

1. Az ABCB1 transzporter funkciója által okozott kollaterális érzékenység (MDR-szelektív toxicitás) jelenségének szisztematikus megközelítéssel történő vizsgálata, az NCI-60 tumorsejtpanel ABCB1 mRNS expressziójának és drogérzékenységi mintázatának korrelációs analízisével.
2. Az *in silico* azonosított MDR-szelektív vegyületek aktivitásának *in vitro* tesztelése, validálása.
3. Az ABCB1 transzporter szerepének tisztázása az MDR-szelektív toxicításban: az ABCB1 funkció szerepe.
4. Az ABCG2 transzporter hatásának vizsgálata az MDR-szelektív vegyületek toxicitására.
5. További MDR-szelektív vegyületek azonosítása hasonlóság-alapú molekulaszűréssel.
6. Az MDR-szelektív vegyületek hosszútávú hatásának vizsgálata sejttenyészetekben.

### 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Felhasznált anyagok és vegyületek

Minden NSC kóddal jelölt vegyület az NCI DTP (National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program) vegyülettárából származik, kivéve a következőket: az NSC716765, NSC716766, és NSC716772 vegyületek Michael M. Gottesman laboratóriumában készültek, az NSC633657 vegyületet John Stonik készítette (NCI), az NSC617961 és az NSC617963 az Auckland Cancer Society Research Centumból (Új-Zéland), az NSC697124 és az NSC697125 az Instituto de Quimica-ból (Mexikó) származnak. A doxorubicin, vinblasztin, mitoxantron, 1,10-fenantrolin, tris(1,10-fenantrolin)-ruténium(III)klorid, desferrioxamin, triapin, PSC833, verapamil vegyületeket, a vas(II)-, réz(II)-, és cink(II)szulfátot, és a DMSO-t a Sigma-Aldrich-től vásároltuk. A tariquidart (XR9576) Dr. Susan Bates-től (NCI) kaptuk.

#### 3.2 A Developmental Therapeutics Program adatbázisa

A DTP vegyületek tízezreinek növekedésgátló hatását teszteli az NCI-60 (National Cancer Institute) humán tumorsejtpanelen. Az *in vitro* citotoxicitási vizsgálatokban a program a sejtvonalak drogérzékenységét 5 koncentrációpontban (általában 10-szeres hígítási sor) elemzi, és 48 órás droginkubáció után az élősejtszámot SRB (szulforodamin B) esszével határozza meg. A vegyületek toxicitását egy adott sejtvonalon az 50%-os növekedésgátlást okozó drogkoncentrációval, az ún. GI<sub>50</sub> (growth inhibition 50) értékekkel jellemzik. A körülbelül 43 ezer vegyület 60 különböző tumorsejtvonalon mutatott toxicitását jellemző, nyilvánosan elérhető GI<sub>50</sub> értékeket a DTP weboldaláról töltöttük le (2007 júliusi eredmények, <https://discover.nci.nih.gov>). Az adatsorból hiányzó dózis-hatás értékek (az analízis adatpontjainak 12,1%-a hiányzik [145]), és a tesztelt koncentráció tartományban tapasztalt aktivitáshiány miatt (az GI<sub>50</sub> értékek 44,9%-a mutat inaktivitást [145]) az adathalmaz ebben a formában nem volt alkalmas statisztikai analízisre. Ezért vegyületszűrést végeztünk és csak azokat a vegyületeket használtuk fel a továbbiakban, melyek esetében a 60 sejtvonalon mért citotoxicitást jellemző GI<sub>50</sub> értékekből min. 30 rendelkezésre állt és citotoxikus aktivitást mutatott.

### 3.3 Az NCI-60 tumorsejtpanel ABCB1 mRNS expressziójának és drogérzékenységének korrelációs analízise

Az NCI-60 tumorsejtpanel 60 sejtvonalának ABCB1 mRNS expressziója és a 60 sejtvonal  $GI_{50}$  értékkel jellemzett drogérzékenysége között korrelációs analízist végeztünk a DTP 42 657 feltételezett rákellenes aktivitással rendelkező vegyületének esetében. A sejtvonalak ABCB1 mRNS expresszióját Szakács és mtsi. kvantitatív real-time PCR-rel határozták meg [141], az expressziót  $C_t$  (a „crossing point”-hoz tartozó ciklusszám, ahol a PCR amplikon mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitás a háttér fluoreszcencia intenzitását áttöri) értékben kifejezve, melynek összefüggése az mRNS koncentrációjával logaritmikus:  $koncentráció=2^{-C_t}$ . A 60 sejtvonal esetében az expressziót az átlagos  $C_t$  értéktől való eltéréssel fejezték ki ( $dC_t$ ), ezeket az értékeket korreláltattuk a vegyületek sejtvonalakon mért logaritmusban kifejezett  $GI_{50}$  értékeivel. Pearson korrelációs koefficienszt számoltunk a Szakács és kollégái által leírt analízisnek megfelelően [141].

### 3.4 A vegyületek kémiai hasonlóságának elemzése

A vegyületek kémiai szerkezeti hasonlóságának analíziséhez meghatároztuk a vegyületek Tanimoto-koefficienseit [146] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). A vegyületek szerkezeti különbözőségét tükröző távolságmátrix alapján hierarchikus klaszterezéssel kerestük a vegyületek között a kémiai struktúrát tekintve koherens alcsoportokat, illetve a távolság értékét 0,6-ra állítva kerestünk az NSC73306, NSC10580, NSC168468, NSC292408 és NSC713048 vegyületekhez hasonló szerkezetű molekulákat (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.5 Sejtvonalak és tenyésztési kondíciók

A KB-3-1 humán méhkarcinóma sejtvonalból az ABCB1 transzportert overexpresszáló KB-V-1 sejtvonalat vinblasztin szelekcióval hozták létre [147]. A humán ABCB1 transzportert kifejező NIH-MDR-G185 sejtvonalat a NIH-3T3 egér fibroblaszt sejtvonalból a pHaMDR1/A vektorral való transzfekcióval állították elő [148]. A MES-SA/Dx5, nagy mennyiségű ABCB1 fehérjét kifejező tumorsejtvonalat doxorubicin szelekcióval hozták létre a parentális MES-SA humán méhszarkóma sejtvonalból [149]. Az A431-B1 és A431-G2 humán ABCB1 ill. ABCG2 transzportereket overexpresszáló epidermoid karcinóma sejtvonalakat retrovirális transzdukcióval állították elő [150]. Az MDCKII (Madin-Darby canine kidney 2) sejtvonalat az ATCC-től (American Type

Culture Collection) vásároltuk. A felsorolt sejtvonalakat DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiumban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A sejtenyészítő médiumot 10% szérummal (FBS, fetal bovine serum), 5mM L-glutaminnal és 50unit/ml penicillin/streptomycin antibiotikum keverékkel egészítettük ki. A drogszelekcióval létrehozott KB-V-1 és MES-SA/Dx5 sejteket a stabil és homogén ABCB1 overexpresszió biztosítására folyamatosan 1µg/ml vinblasztinban [147] ill. 500nM doxorubicinben tenyésztettük [151]. A kísérletek megkezdése előtt egy héttel a sejteket minden esetben drogmentes médiumba helyeztük át.

### 3.6 Citotoxicitás vizsgálat

A sejteket 24 órával a droginkubáció megkezdése előtt 5000 sejt/lyuk mennyiségben, 100µl médium/lyuk térfogatban 96-lyukú tenyésztőlemezre raktuk ki. Másnap a vizsgálandó vegyületből hígítási sort készítettünk, és a drogtartalmú médiumot 100µl/well térfogatban adtuk a sejtekhez az ABCB1 ill. az ABCG2 inhibitorának jelenlétében vagy anélkül. A sejteket 72 órán át inkubáltuk 37°C-on termosztátban, majd az élősejtszámot MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium)bromid (Lifetechnologies) esszével határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A citotoxicitási teszteket 3 párhuzamossal végeztük. Az élősejtszámot a drogkezelést nem kapott sejtekhez normalizálva ábrázoltuk a vegyület koncentrációjának függvényében. A Prism 5.0 software (GraphPad Software) segítségével a mérési pontokra nem-lineáris regressziós modellt alkalmazva szigmoidális, változó meredekségű dózis-hatás görbét illesztettünk. A görbeillesztés statisztikai adatai alapján határoztuk meg az 50%-os növekedésgátláshoz (IC<sub>50</sub>, inhibitory concentration 50) tartozó drogonkoncentráció értéket, mely az adott sejtvonalon a vegyület toxicitását jól jellemzi. Hasonlóképpen számoltuk a 25%-os növekedésgátláshoz tartozó drogonkoncentráció értékeket (IC<sub>25</sub>). A sejtvonalak IC<sub>50</sub> értékeinek különbözőségét kétféleképpen t-próbával elemeztük 3 független kísérlet eredménye alapján. A p<0,05 esetben tekintettük a különbséget statisztikailag szignifikánsnak. A parentális és az ABCB1 vagy ABCG2 transzportereket overexpresszáló sejtvonalak érzékenységeinek összehasonlítását ún. szelektivitási arányt számolva végeztük, mely a parentális sejtvonal IC<sub>50</sub> értékének ill. a transzportert kifejező sejtvonal IC<sub>50</sub> értékének hányadosa ( $IC_{50}^{\text{parentális sejtvonal}}/IC_{50}^{\text{transzportert kifejező sejtvonal}}$ ). A hányados 1-nél kisebb értéke a transzportert kifejező sejtek rezisztenciáját, 1-nél nagyobb értéke ezen sejtek túlérzékenységét jelöli.

### 3.7 Drogkezelés

Az ABCB1 transzportert overexpresszáló sejteket 3 hétig tenyésztettük az MDR-szelektív vegyületek IC<sub>25</sub> koncentrációjában, ill. a hatóanyaggal kezeltlen sejteket megfelelő DMSO (a vegyületek oldószere) tartalom mellett. A sejteket hetente kétszer passzáltuk és vettük fel friss, megfelelő hatóanyag koncentrációjú médiumban.

### 3.8 *Sleeping Beauty* transzpozon vektor konstrukciók előállítása

A vad típusú, a K433M és K1076M egyoldali, ill. a K433M/K1076M kétoldali “Walker A” mutáns ABCB1 cDNS-eket tartalmazó *Sleeping Beauty* transzpozon vektorokat a következőképpen állítottuk elő. “Site-directed” mutagenézist végeztünk a humán ABCB1 vad típusú cDNS-ét tartalmazó pAcUW-LMDR1 vektoron [152]. A mutációkat a QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) útmutatásainak megfelelően állítottuk elő. A következő oligonukleotid primerekkel végeztük a mutagenézist: 5’-AAACAGTGGCTGTGGGATGAGCACAACAGTCCAGCTGA-3’ (K433M) 5’-CAGCAGTGGCTGTGGGATGAGCACAGTGGTCCAGCTCC-3’ (K1076M).

Az EGFP és a puromycin (PURO) rezisztencia gén cDNS-eit két külön expressziós kazettában tartalmazó *Sleeping Beauty* (SB) transzpozon vektort [153] ill. a transzpozáz enzim cDNS-ét tartalmazó expressziós vektort Dr. Orbán Tamás István bocsátotta rendelkezésünkre (Magyar Tudományos Akadémia). Mindkét expressziós kazetta aktivitását a CAG (C: cytomegalovirus enhancer element, A: chicken β-actin promoter, G: rabbit β-globin splice acceptor element) promoter szabályozza. A teljes hosszúságú vad típusú ABCB1 cDNS-t a pAcUW-LMDR1 vektorról amplifikáltuk a következő primerekkel: 5’-TAGAATACCGGTAGGTCGGAATGGATCTTGAA-3’ és 5’-AGTGATGGATCCAACATCTCATACAGTCAGAG-3’, melyek a sorrendnek megfelelően AgeI és BamHI restrikciós endonukleáz helyeket tartalmaznak. Az emésztett PCR terméket az SB-EGFP-PURO transzpozon vektor AgeI és BclI restrikciós helyei közé ligáltuk, az EGFP cDNS-ét kicserélve, megkapva az SB-MDR1-PURO vektort. Ezek után az SB-MDR1-PURO vektor ABCB1 cDNS-ének PstI-BstBI restrikciós fragmensét cseréltük ki a mutáns cDNS fragmensekre, melyek a mutagenézissel létrehozott pAcUW-LMDR1K433M és pAcUW-LMDR1K1076M vektorokból származtak, előállítva az SB-MDR1K433M-PURO ill. SB-MDR1K1076M-PURO transzpozon vektorokat. A kétoldali mutáns ABCB1 (K433M/K1076M) cDNS-t tartalmazó SB transzpozon vektor előállítása az SB-MDR1K433M-PURO vektor K433M



mutációt tartalmazó 3242bp hosszúságú HindIII-HindIII fragmensének SB-MDR1K1076M-PURO vektorba való áthelyezésével történt. A vektorkonstrukciók előállítása után a kapott SB vektorok ABCB1 cDNS-einek szekvenciáit teljes hosszúságukban ellenőriztük.

### **3.9 Vad típusú és „Walker A” mutáns ABCB1 transzportert kifejező MDCKII sejtvonalak előállítása**

A vad típusú, K433M, K1076M, és K433M/K1076M mutáns ABCB1 fehérjét stabilan kifejező MDCKII sejtvonalakat a *Sleeping Beauty* transzpozon-alapú génbeviteli eljárással állítottuk elő, a 100-szoros hiperaktivitást mutató SB transzpozáz enzim alkalmazásával [154, 155]. Az MDCKII (Madine-Darby canine kidney 2) sejteket az SB transzpozáz cDNS-et tartalmazó expressziós vektorral és az SB transzpozon vektorral kotranszfectáltuk a Lipofectamine2000 reagenssel (Life Technologies) a gyártó utasításainak megfelelően. Röviden, a sejteket 6-lyukú tenyésztőlemezre,  $3 \times 10^5$  sejt/lyuk mennyiségben raktuk ki, majd 24 órával később transzfectáltuk őket lyukanként 2 $\mu$ g vektor DNS-sel. A DNS 10:1 arányban tartalmazta a vad típusú ill. mutáns SB transzpozon ill. a transzpozáz vektorkonstrukciókat. A transzgen pozitív sejteket 48 órával a transzfectió után áramlási citometriával válogattuk ki (FACS Aria High Speed Cell Sorter, Beckton-Dickinson), a sejtek felszíni ABCB1 fehérje expressziója alapján, amit a humán-specifikus monoklonális MRK16 antitesttel (Abnova) történő jelöléssel mértünk. A pozitív sejtek kiválogatását (szortolás) 2 héttel később megismételtük, hogy homogén és magas fehérje expressziót mutató sejtpopulációt kapjunk. A sejteket összesen 3 alkalommal szortoltuk.

### **3.10 Sejtfelszíni humán ABCB1 expresszió mérése áramlási citometriával**

A tenyésztőflaskából tripszinezés után médiumban felvett sejteket mintánként  $3 \times 10^5$  sejt mennyiségben osztottuk szét. A sejteket kétszer mostuk 1 ml 0,5%-os BSA (bovine serum albumin) tartalmú PBS-sel (BSA-PBS) (phosphate buffered saline), végül 250 g-vel 5 percig centrifugálva, a felülszót leöntve 50 $\mu$ l végtérfogatban végeztük az indirekt antitestes jelölést. A sejteket először 50 $\mu$ l BSA-PBS-ben felvéve, 0,5 $\mu$ l MRK16 elsődleges antitest hozzáadásával inkubáltuk 30 percig, 37°C-on vízfürdőben rázatva. Az MRK16 antitest izotípusával megegyező, IgG2a izotípusú (egér IgG2a, Santa Cruz Biotechnology) elsődleges antitesttel (izotípus kontroll) hasonlóképpen jelöltük a

sejteket. Minden vizsgálandó sejtminta esetében párhuzamosan izotípus kontroll jelölést is végeztünk az MRK16 aspecifikus kötődésének kizárására. 30 perc után 1ml BSA-PBS-sel mostuk, centrifugáltuk a sejteket, majd 0,5µl fikoeritrinnel jelölt másodlagos (GAM-PE, Invitrogen, goat anti-mouse) antitesttel 50µl BSA-PBS-ben 30percig 37°C-on vízfürdőben rázatva végeztük a következő jelölést. Újbóli mosás után a sejteket 200µl PBS-ben vettük fel, a nem élő sejtek elkülönítésére Topro3 festéket használtunk 0,2µM koncentrációban. A fikoeritrin fluoreszcencia intenzitását a FACS Calibur (Beckton-Dickinson) FL2-es, a Topro3 fluoreszcencia intenzitását az FL4-es csatornában mértük. A sejteket a törmeléktől az FSC (forward scatter) és az SSC (side scatter) fényintenzitások alapján különítettük el, majd az ABCB1 expressziót az alacsony Topro3 fluoreszcencia intenzitású, élő sejtekre kapuzva mértük.

### **3.11 Az ABCB1 transzporter funkció mérése calcein-AM esszével**

A calcein-AM (calcein-acetoxi-metilészter) esszé alkalmas az ABCB1 transzporter funkciójának érzékeny analizisére [156]. A módszer az ABCB1 szubsztrát calcein-AM-ből intracellulárisan, észteráz enzimek aktivitása révén keletkező calcein felhalmozódását méri a sejtekben. A calcein-AM nem, kizárólag a calcein fluoreszcens tulajdonságú. A sejtek fluoreszcencia intenzitása a funkcionáló ABCB1 mennyiségével negatívan korrelál. Az esszé a transzporter funkció kvantitatív mérésére is alkalmas, ún. MAF (multidrug resistance activity factor) érték számításával. A faktor a sejtek verapamil (ABCB1 inhibitor) jelenlétében ill. annak hiányában mért calcein felvételéből számolható.  $MAF = (F^* - F) / F^*$ , ahol az  $F^*$  a verapamil jelenlétében, az  $F$  az inhibitor hiányában mért átlagos fluoreszcencia intenzitást (mean fluorescence) jelöli [156].

A tenyésztőflaskából tripszinezés után médiumban felvett sejteket PBS-es mosás után  $3 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban, 100µl-enként HPMI oldatban szétosztottuk (10mM HEPES, 120mM NaCl, 5mM KCl, 0,4mM MgCl<sub>2</sub>, 0,04mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM glükóz, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O; pH 7,4). 50µl verapamil tartalmú (10µM végkoncentráció), vagy üres HPMI oldat hozzáadása után előinkubáltuk a sejteket 5 percig 37°C-os vízfürdőben, rázatva. Ezt követően a calcein-AM szintén 50µl HPMI oldatban való hozzáadása után (0,25µM végkoncentráció) 10 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-os vízfürdőben, rázatva, majd 1ml 4°C-os HPMI-vel mostuk a sejteket. Centrifugálás után a sejteket 250µl 4°C-os HPMI-ben felvéve, jégen tároltuk a mintákat a FACS analízis megkezdéséig. A halott sejtek elkülönítésére Topro3 festéket használtunk

0,2 $\mu$ M koncentrációban. A calcein fluoreszcencia intenzitását a FACS Calibur FL1-es, a Topro3 fluoreszcencia intenzitását az FL4-es csatornában mértük. A sejteket a törmeléktől az FSC (forward scatter) és az SSC (side scatter) fényintenzitások alapján különítettük el, majd a calcein fluoreszcenciát az alacsony Topro3 fluoreszcencia intenzitású, élő sejtekre kapuzva mértük.

### **3.12 Az ABCB1 transzporter funkció mérése rhodamine123 akkumulációval**

A 24-lyukú tenyésztőlemezre 24 órával a mérés előtt kirakott sejteket ( $2 \times 10^5$  sejt/well) 2 $\mu$ M rhodamine123 tartalmú médiumban inkubáltuk 30 percig 37°C-on. A médium leszívása után a sejteket kétszer mostuk 4°C-os PBS-sel, majd PBS hozzáadása után fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk a sejtek által felvett rhodamine123 mennyiségét a zöld fluoreszcencia alapján.

### **3.13 Teljes RNS izolálás**

1ml Trizol reagensben (Lifetechnologies)  $3 \times 10^6$  sejtet felvéve, a sejtlyúzátumot pipettával homogenizáltuk. A következőkben a gyártó útmutatásait követtük. Röviden, mintánként 200 $\mu$ l kloroform hozzáadásával 12000g-n történő 10 perces centrifugálás után az Eppendorf-csőben elkülönülő legfelső, RNS-t tartalmazó vizes fázist leszívtuk, 0,5ml 100%-os izopropanol hozzáadásával kicsaptuk. Újabb centrifugálás után a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, majd beszárítottuk steril fülke alatt. Az RNS csapadékot 40 $\mu$ l bidesztvízben oldottuk fel 55°C-on inkubálva a mintákat 10 percig. A minták RNS koncentrációját a spektrofotométerrel 260nm-en mért abszorbancia, tisztaságát a 260nm-en ill. a 280nm-en mért abszorbancia hányadosa alapján határoztuk meg. Az izolált totál RNS mintákat -70°C-on tároltuk.

### **3.14 cDNS átírás**

A totál RNS preparátumból a Reverse Transcriptase System Kittel (Promega) készítettünk cDNS-t a gyártó útmutatásai alapján. A reverz transzkripciót 20 $\mu$ l végtérfogatban végeztük, 1 $\mu$ g totál RNS-ből kiindulva. Az átíráshoz AMV (avian myeloblastosis virus) reverz transzkriptázt, RNáz gátló Rnasin-t és random primert használtunk. Az átírást 42°C-on, 1 óráig végeztük. A cDNS-t -20°C-on tároltuk.

### 3.15 Real-time PCR

Az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt ill. kezeletlen sejtek humán ABCB1 mRNS expresszióját kvantitatív real-time (valós idejű) PCR-rel, taqman esszével határoztuk meg.  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel határoztuk meg a sejtek relatív ABCB1 mRNS expresszióját, a  $\beta$ -aktin ill.  $\beta$ 2-mikroglobulin háztartási gének expressziójához való normalizálással, a kezeletlen, ABCB1 transzportert overexpresszáló sejtek génexpressziójához viszonyítva. A PCR-t 20  $\mu$ l végtérfogatban végeztük, 10  $\mu$ l 2x tömény Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Lifetechnologies), 1  $\mu$ l Taqman esszé mix (for és rev primerek, taqman próba, Applied Biosystems, Lifetechnologies), és 5  $\mu$ l desztvízzel 10-szeresére hígított cDNS, és 4  $\mu$ l desztvíz hozzáadásával. A PCR program a következő: denaturáció 95°C, 10 perc, majd 40 ciklus 95°C 15 sec (denaturáció) és 60°C 60 sec (annealing és elongáció). Az ABCB1 és a háztartási gének expresszióját 3-3 párhuzamossal mértük. A diagramokon a relatív expressziót és annak szórását ábrázoltuk.

### 3.16 Western blot

A tenyésztőflaskából tripszinezés után médiumban felvett sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd felvettük Laemmli pufferben ( $1 \times 10^6$  sejtet 100  $\mu$ l térfogatban). A lizátumot 10 másodperces ultrahangos kezeléssel homogenizáltuk. A minták fehérje koncentrációját Lowry-módszerrel határoztuk meg. A fehérjemintákat 7,5%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el Mini-Protean elektroforézis készülékkel (BioRad). A szétválasztott fehérjéket 0,2  $\mu$ m pórusméretű PVDF membránra (BioRad) blottoltuk át. A membránt ezután 5%-os sovány tejporthoz tartalmazó TBS-TWEEN pufferben (50 mM pH 7,4 Tris, 200 mM NaCl és 0,1% Tween 20) blokkoltuk 1 órán át. Az ABCB1 fehérje detektálásához először egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a membránt C219 monoklonális elsődleges antitestben (Calbiochem, 517310), 1000-szeres hígításban. Majd háromszor 20 perces TBS-TWEEN-nel való mosás után 1 órán át inkubáltuk a membránt a másodlagos, tormaperoxidázzal konjugált anti-egér antitesttel (Jackson, 715-035-151), 20000-szeres hígításban. Háromszor 20 perces TBS-TWEEN-nel való mosás után a peroxidáz függő lumineszcenciát „enhanced chemiluminescence” technikával (ECL, Amersham), röntgenfilm-előhívással határoztuk meg. Belső kontrollként  $\beta$ -aktin elsődleges antitestet használtunk (Sigma, A1978) 4000-szeres hígításban. A Western blotokat Kucsma Nóra készítette.

## 4 EREDMÉNYEK

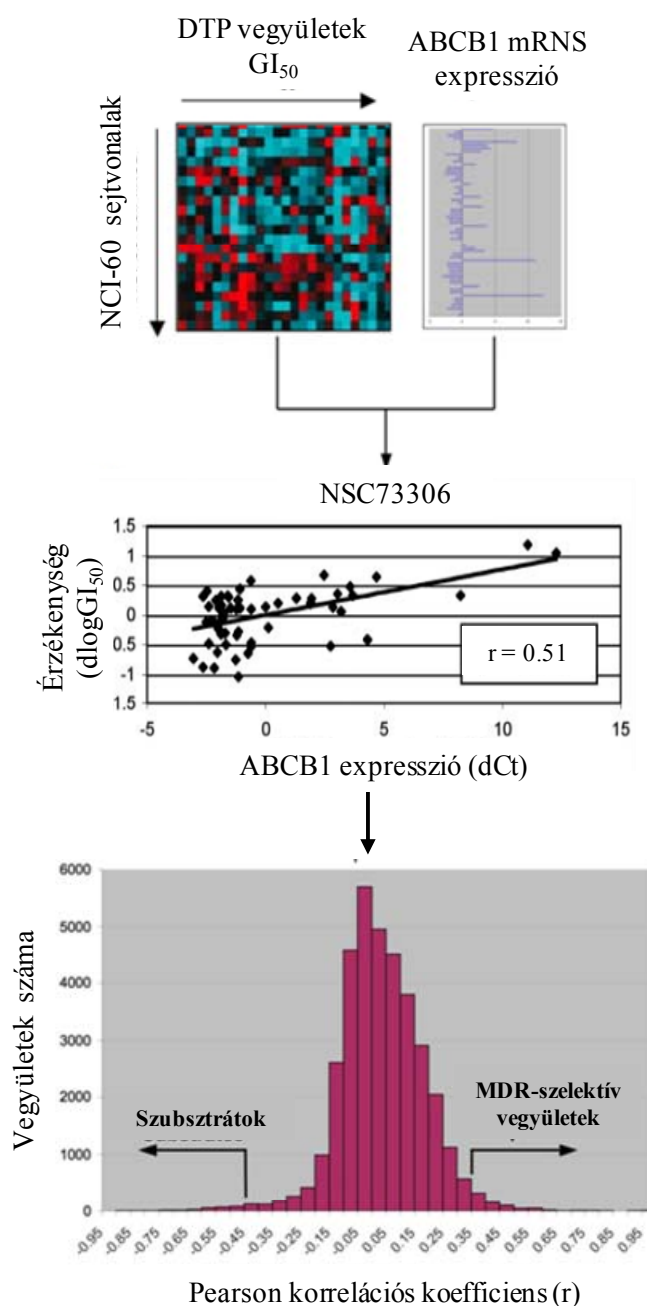
### 4.1 MDR-szelektív molekulák azonosítása a Developmental Therapeutics Program vegyülettárából korrelációs analízissel és kémiai szerkezeti hasonlóság alapján

#### 4.1.1 MDR-szelektív molekulajelöltek azonosítása az NCI-60 sejtpanel ABCB1 expressziós és drogérzékenységi mintázatának korrelációs analízisével

Az ABCB1 transzporter kifejeződése esetén szelektíven megnövekedett toxikus aktivitású vegyületek (MDR-szelektív vegyületek) azonosítására *in silico* megközelítést alkalmaztunk. A Developmental Therapeutics Program (DTP) 2007. júliusában elérhetővé vált teljes adatsora 42 657 feltételezett rákellenes hatású vegyület toxicitási profilját tartalmazza, mely a NCI-60 tumorsejtpanelen végzett *in vitro* citotoxicitási vizsgálatokból származik. A 60 tumorsejtvonal DTP-ből elérhető drogérzékenységi adatait és a sejtvonalak kvantitatív real-time PCR-rel meghatározott ABCB1 mRNS expressziós adatsorát [141] használtuk fel MDR-szelektív tulajdonsággal rendelkező molekulajelöltek azonosítására. A sejtpanel DTP weboldaláról (<http://discover.nci.nih.gov>) letöltött drogérzékenységi adatai számos vegyület esetében nem szolgáltatott megfelelő információt, mivel a vegyületek vagy nem váltottak ki toxikus hatást, vagy hiányoztak a toxicitási adatok. Ezért előzetes adatszűrést végeztünk és a vegyületek egy részét kizártuk a vizsgálatból (lásd 3.2). Ilyen módon magasabb minőségű adatsorral dolgozhattunk.

Korrelációs analízist végeztünk az NCI-60 sejtpanel ABCB1 expressziós és drogérzékenységi adatsorával olyan vegyületeket keresve, melyek esetében a Pearson korrelációs koefficiens  $r \geq 0,4$ -nek bizonyult (5. ábra). A pozitív korreláció a növekvő transzporter kifejeződés esetében növekvő drogérzékenységre felel meg, ami feltételezésünk szerint az MDR-szelektív tulajdonságra utal. A vegyületek 97,4%-ában a korreláció értéke  $-0,4 \leq r \leq 0,4$  közé esett, amit a korreláció hiányaként ill. gyenge korrelációként értelmeztünk. Feltételezésünk szerint ezen értékek nem jelzik egyértelműen az ABCB1 szubsztrát tulajdonság, vagy az MDR-szelektív tulajdonság hiányát, mivel a toxicitásra való érzékenységet az ABCB1 transzporterén kívül számos egyéb sejtes faktor befolyásolhatja (pl. az intracelluláris akkumulációt befolyásoló tényezők: lebontó enzimek működése, a plazmamembrán csökkent permeabilitása, egyéb transzporterek működése), ami elfedheti az ABCB1 transzporter szerepét a sejtválaszban. Bár az analízis számos ABCB1 szubsztrátjelölt molekulát is azonosított ( $r \leq -0,4$ ), az erős

pozitív korrelációt mutató ( $r \geq 0,4$ ) 64 MDR-szelektív molekulajelöltre fókuszáltunk, melyek korrelációs értékeit az 3. számú táblázat tartalmazza. Mivel az itt alkalmazott korrelációs analízist Szakács és mtsi már validálták ABCB1, ABCC2 és ABCC11 szubsztrátok azonosítása során [141], azt feltételeztük, hogy a jelölt vegyületek között valóban találunk majd az ABCB1 jelenlétében fokozott toxicitást mutató vegyületeket.



**5. ábra: MDR-szelektív molekulajelöltek azonosítása korrelációs analízissel a DTP vegyülettárából.** Az NCI-60 sejtpanel ABCB1 mRNS expressziós és DTP vegyületekkel szemben mutatott drogérzékenységi mintázatát korreláltatva kerestünk MDR-szelektív vegyületeket. A sematikus ábra az NCI-60 sejtpanel két mintázatának korrelációs analízisét szemlélteti. A középső diagram függőleges tengelye a 60 sejtvonal NSC73306-tal szemben mutatott drogérzékenységét ( $GI_{50}$  értékek), a vízszintes tengely a sejtvonalak ABCB1 expresszióját mutatja. A korrelációs

elemzéssel kapott Pearson koefficiensek eloszlása a DTP vegyületek között az alsó ábrán látható. A DTP 43 ezer vegyületének 97,4%-ának esetében nem találtunk erős korrelációt az ABCB1 expresszió és a drogérzékenység között. A vegyületek egy része azonban erős negatív, vagy pozitív koefficienssel jellemezhető, mely utóbbiakat MDR-szelektív molekulajelölteknek tekintettük.

Vegyület(NSC)	Pearson	Szelektivitási arány	Vegyület(NSC)	Pearson	Szelektivitási arány	Vegyület(NSC)	Pearson	Szelektivitási arány
10580	0.41	1.71 ± 0.26*	639743	0.42	NA	697120	0.44	NA
43320	0.56	2.08 ± 0.37*	641208	0.43	2.13 ± 0.09 <sup>‡</sup>	697124	0.46	2.07 ± 0.49*
73306	0.51	3.64 ± 0.93*	647574	0.42	NT	697125	0.54	2.33 ± 0.79*
86715	0.53	≤1	649816	0.47	1.17 ± 0.12*	697128	0.43	NA
168468	0.48	3.82 ± 0.85 <sup>‡</sup>	651782	0.43	NA	697129	0.47	NA
292408	0.45	2.80 ± 0.76*	651859	0.43	NA	697135	0.43	NA
356777	0.4	1.64 ± 0.42 <sup>‡</sup>	653864	0.41	NA	697137	0.43	NA
403148	0.4	NT	654724	0.41	NA	697678	0.43	NA
617961	0.42	≤1	669341	0.41	≤1	697920	0.41	NA
617963	0.53	≤1	672027	0.55	≤1	705301	0.43	NA
621481	0.45	≤1	672036	0.42	1.27 ± 0.16*	705305	0.43	NA
624967	0.41	NA	673999	0.59	1.99 ± 0.32*	709976	0.47	NA
626670	0.42	NA	681125	0.44	NA	710857	0.44	1.47 ± 0.25*
632591	0.4	NA	688942	0.4	NA	713048	0.41	1.71 ± 0.34*
632731	0.53	NA	692419	0.42	≤1	716765	0.5	1.80 ± 0.20 <sup>‡</sup>
632733	0.46	NA	693046	0.43	≤1	716766	0.48	1.64 ± 0.20 <sup>‡</sup>
632736	0.47	NA	693336	0.45	NA	716768	0.52	1.92 ± 0.07 <sup>‡</sup>
632738	0.43	NA	693630	0.4	NA	716772	0.52	2.67 ± 0.61 <sup>‡</sup>
632955	0.47	≤1	693871	0.68	8.48 ± 3.15 <sup>‡</sup>	720611	0.55	NA
633657	0.45	NT	693872	0.45	3.90 ± 1.37 <sup>‡</sup>	720612	0.64	NA
635977	0.42	NA	695331	0.44	2.60 ± 0.86*			
636097	0.42	≤1	695333	0.58	3.11 ± 1.99*			

**3. táblázat: MDR-szelektív molekulajelöltek és a közülük in vitro validált MDR-szelektív vegyületek.** A táblázatban az MDR-szelektív molekulajelöltek és a hozzájuk tartozó Pearson korrelációs koefficiensek találhatók, melyek az NCI-60 sejtpanel ABCB1 expressziós és drogérzékenységi mintázatának korrelációs analiziséből származnak. Ahhoz, hogy a jelölt vegyületek MDR-szelektív tulajdonságát validálhassuk, számos forrásból szereztük be a fenti jelölt vegyületeket. Legtöbbet a DTP bocsátotta rendelkezésre, néhányat kutatócsoportunk szintetizált, ill. néhány más kutatócsoportokon keresztül vált hozzáférhetővé. Az elérhető vegyületek toxicitását jól jellemző IC<sub>50</sub> értékeket (inhibitory concentration 50) citotoxicitási esszében határoztuk meg a KB-3-1, és az ABCB1 transzportert overexpresszáló KB-V1 sejtvonalpáron. A nem elérhető vegyületeket NA (not available) jelzéssel láttuk el. Az MDR-szelektív toxicitást a vegyület KB-3-1 sejten mutatott IC<sub>50</sub> értékének és KB-V1 sejten mutatott IC<sub>50</sub> értékének hányadosa alapján határoztuk meg. Az 1-nél nagyobb hányados az MDR-szelektív aktivitást jelzi (vastag betűvel jelezve), miszerint a vegyület az ABCB1-et kifejező sejteket hatékonyabban pusztítja. Az 1-nél kisebb hányados a vegyület szubsztrát tulajdonságára, az 1 értékű hányados az ABCB1 toxicitásra gyakorolt semleges hatására utal. Az inaktív vegyületeket, melyek IC<sub>50</sub> értéke 50 µmol/L-nél magasabb volt, NT jelzéssel láttuk el (not toxic), MDR-szelektív

tulajdonságuk nem volt meghatározható.\* Szignifikancia szint,  $P < 0,05$  ; † Szignifikancia szint,  $P < 0,01$  ; # Szignifikancia szint,  $P < 0,001$ . Türk és mtsi. *Cancer Res* 2009; 69: (21), 8293-8301.

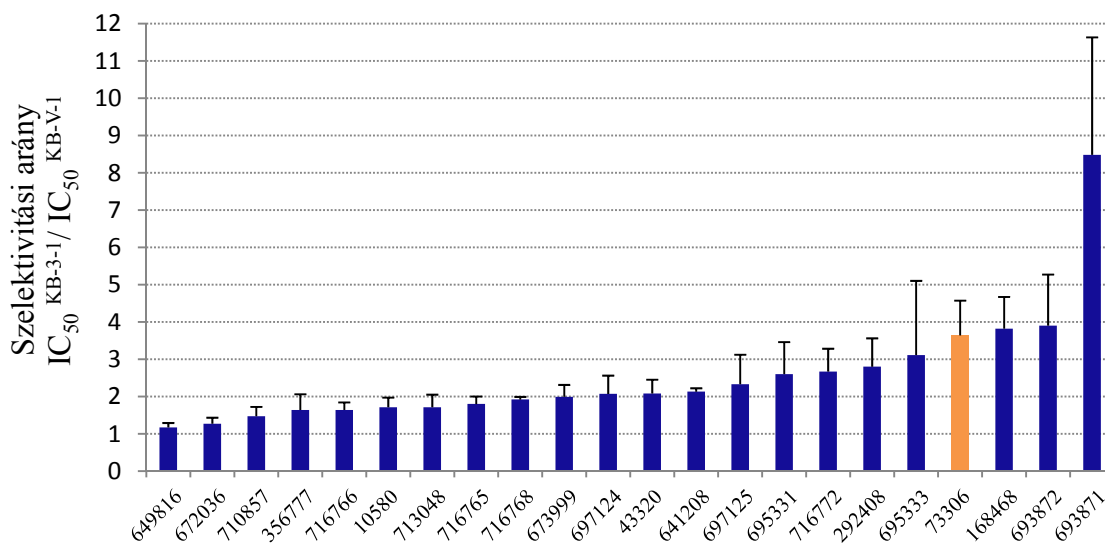
#### 4.1.2 Az MDR-szelektív aktivitás igazolása citotoxicitási vizsgálatokkal

Annak igazolására, hogy a korrelációs analízis eredményeképpen kapott MDR-szelektív molekulajelöltek toxikus hatását valóban fokozza az ABCB1 transzporter overexpressziója, a DTP vegyülettárából ill. 8 esetben egyéb forrásból hozzáférhető, összesen 35 vegyülettel citotoxicitási méréseket végeztünk. Kísérleteinkhez egy olyan humán tumorsejtvonalpárt használtunk, melyet az NCI-60 sejtpanel nem tartalmazott. A méhkarcinóma eredetű humán KB-3-1 sejtvonal és az ebből vinblasztin szelekcióval létrehozott, az ABCB1 transzportert nagy mennyiségben overexpresszáló KB-V-1 sejtvonal jól karakterizált és gyakran használt sejtmódel a multidrogrezisztencia-kutatásban.

Az MDR-szelektív tulajdonságot, azaz a vegyületek fokozott toxikus hatását az ABCB1 transzportert overexpresszáló sejtvonalon, a vegyület KB-3-1 és KB-V1 sejtvonalakon mért  $IC_{50}$  értékeinek hányadosával definiáltuk ( $IC_{50}^{KB-3-1} / IC_{50}^{KB-V-1}$ ). Ha a vegyület toxikusabb a KB-V1 sejtvonalon, a hányados értéke nagyobb 1-nél, jelölve az MDR-szelektív tulajdonságot. A 35 vizsgált vegyületből 3 nem volt toxikus, mivel  $IC_{50}$  értékük magasabb volt 50  $\mu\text{mol/L}$ -nél. További 10 molekulajelölt hasonló módon gátolta mindkét sejtvonal növekedését, azt jelezve, hogy citotoxikus hatásukat az ABCB1 jelenléte nem befolyásolja. Következésképpen a 35 vegyületből 22 mutatott preferenciális növekedésgátlást az ABCB1-et overexpresszáló KB-V1 sejtvonalon, azaz bizonyult az *in vitro* validálás során MDR-szelektívnek, ami a molekulajelölt vegyületek 63%-át jelenti (3. táblázat).

A szelektív vegyületek fele 2-4-szeres szelektivitási arányt ( $IC_{50}^{KB-3-1} / IC_{50}^{KB-V-1}$ ) mutatott a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpáron, ami hasonló mértékű a DTP vegyülettárából elsőként azonosított [141] NSC73306 szelektív aktivitásához ( $3,64 \pm 0,93$ ). A fennmaradó vegyületeknél ez az érték kisebb volt 2-nél. Az NSC693871 vegyület kiugróan magas, több mint 8-szoros toxicitás-növekedést mutatott az ABCB1 transzportert kifejező KB-V1 sejtvonalon a parentális sejtvonalhoz képest (3. táblázat és 6. ábra).





**6. ábra:** A validált MDR-szelektív vegyületek szelektív toxicitásának mértéke a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpáron. A 22 validált MDR-szelektív vegyület szelektív citotoxicitását jellemző  $IC_{50}^{KB-3-1}/IC_{50}^{KB-V-1}$  hányadosok. A szisztematikus analízissel a DTP vegyülettárból elsőként azonosított NSC73306 [141] szelektivitási arányát narancssárga színnel jelöltük. A számok a vegyületek NSC azonosítói. Az 1-nél nagyobb hányados az MDR-szelektív aktivitást jelzi, miszerint a vegyület az ABCB1-et kifejező sejteket hatékonyabban pusztítja.

#### 4.1.3 A 64 feltételezett MDR-szelektív vegyület kémiai diverzitásának jellemzése klaszteranalízissel

Feltételezve, hogy a vegyületek ABCB1 transzporter funkciójától függő fokozott toxicitása és kémiai szerkezete egymással összefüggést mutathat, megvizsgáltuk az MDR-szelektív vegyületek kémiai diverzitását. Mivel a korrelációs analízissel azonosított 64 MDR-szelektív molekulajelölt közül mindössze 35 volt elérhető, továbbá, mivel a prediktált vegyületek 63%-a valóban MDR-szelektívnek bizonyult, a vegyületek kémiai szerkezetének hasonlósági vizsgálatát a 64 vegyülettel végeztük el.

A molekulák egymáshoz viszonyított strukturális hasonlóságát Tanimoto koefficienssel jellemeztük, mely több száz szerkezeti jelleg alapján számol kémiai hasonlóságot [146]. A kapott távolság-mátrix alapján hierarchikus klaszterezés segítségével kerestük a hasonló szerkezeti alapmotívumokkal jellemezhető vegyületcsoportokat (7. ábra).

Érdekes módon, a 64 molekula között 9 tioszemikarbazont találtunk, melyek közül 5 vegyület izatin- $\beta$ -tioszemikarbazon struktúrát mutatott: NSC73306, NSC716765,

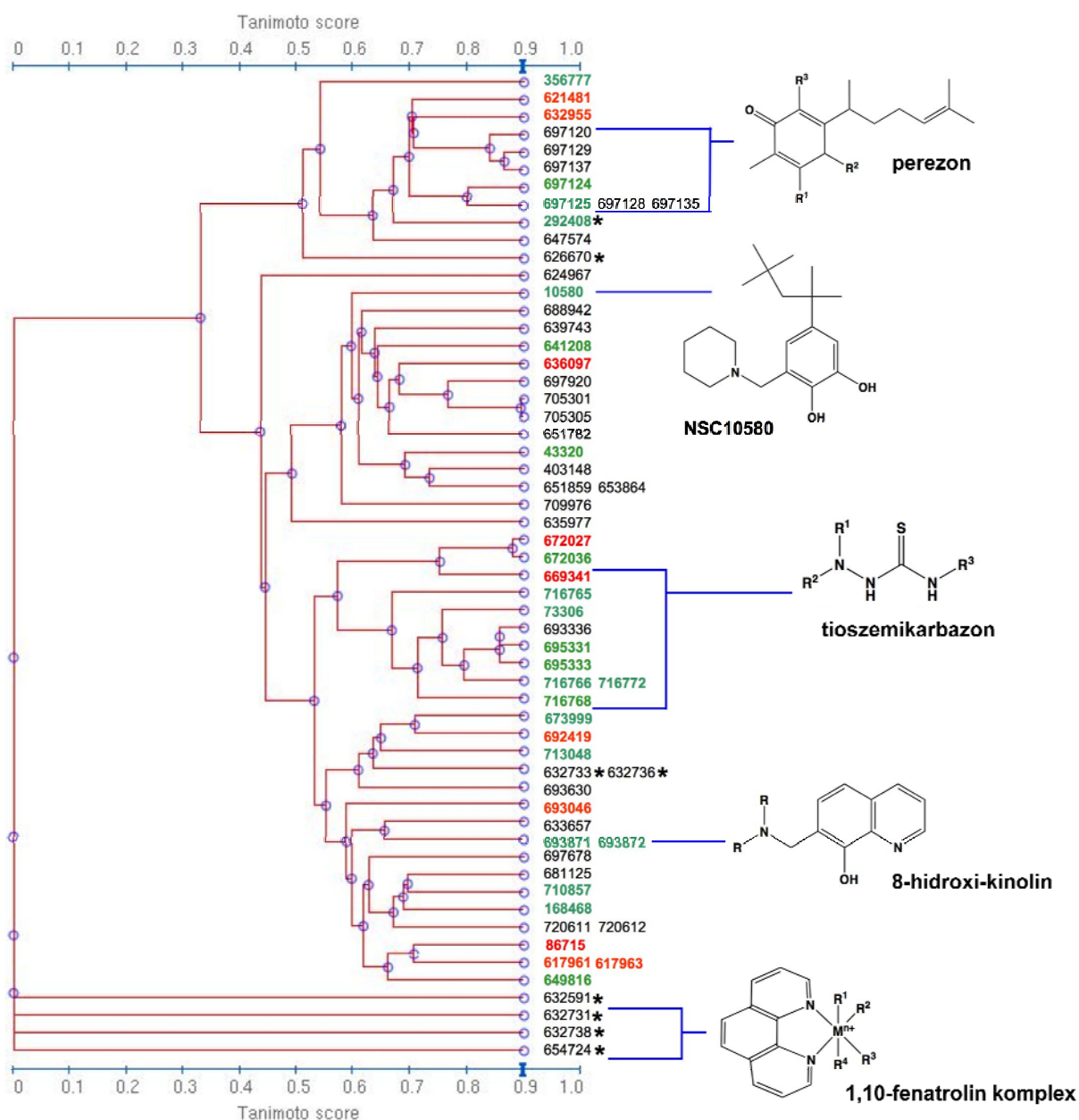
NSC716766, NSC716768, NSC716772, NSC669341, NSC693336, NSC695331, NSC695333 (dőlt betűvel az izatin- $\beta$ -tioszemikarbazonok), azaz a DTP vegyülettárából elsőként azonosított MDR-szelektív NSC73306 kémiai alapstuktúrájával azonos motívumot. Mindez az izatin- $\beta$ -tioszemikarbazon szerkezeti motívum és az MDR-szelektív toxicitás szoros összefüggésére utal. A tioszemikarbazonok biológiai aktivitása gyakran köthető az intracelluláris fémionok kelálásához, fémion depléciót vagy aktív centrumában fémiont tartalmazó enzimek gátlását okozva [157, 158].

A vegyületek között továbbá 8 fémkomplex található, melyek közül 7 molekula 1,10-fenantrolin vagy 2,2'-bipiridin ligandumot tartalmaz (NSC292408, NSC626670, NSC632733, NSC632736, NSC632591, NSC632731, NSC632738, NSC654724), illetve 6 esetben a komplex fémionja lantanoid. A fenantrolin és bipiridin szerkezeti motívumok szintén jól karakterizált, keláló struktúrák, melyek antiproliferatív aktivitása a tioszemikarbazonokhoz hasonlóan jól ismert [159, 160].

Két, egymáshoz nagyon hasonló 8-hidroxi-kinolin analóg (NSC693871, NSC693872) is található a vegyületek között, mely struktúra keláló tulajdonsága és hatékony rákellenes aktivitása is jól ismert [161].

A 8 benzokinon motívumot tartalmazó vegyület közül 7 természetes eredetű perezon származék (NSC697125, NSC697124, NSC697129, NSC697120, NSC697128, NSC697137, NSC697135), melyek redox aktivitása, és mitokondriális ATP szintézist gátló hatása ismert [162].

A fennmaradó 37 vegyület kémiai szerkezetét tekintve változatos, közülük néhány molekula ismert toxikum analógja, mint például a podofillotoxin analógok (NSC403148, NSC651859, NSC653864), és az olivacin analóg NSC86715 [163]. Az NSC168468 pedig egy szabadalom szerint Bcl-2 inhibitor.



7. ábra: A dendrogram a 64 feltételezett MDR-szelektív vegyület Tanimoto hasonlóságon alapuló hierarchikus klaszterezésének eredményét mutatja. A klaszteranalízis alapjául szolgáló távolságmátrixot Tanimoto hasonlóságból számoltuk (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). A számok a vegyületek NSC azonosítói. A feketével jelzett molekulák nem voltak elérhetőek MDR-szelektív aktivitásuk in vitro validálására. A zöld színnel jelzett vegyületek MDR-szelektív aktivitása igazolt, a piros szín a fenotípus hiányát mutatja. Az egy vagy több MDR-szelektív vegyületet tartalmazó, strukturálisan hasonló vegyületekből felépült klaszterek mellett a jellemző, közös szerkezeti motívumok láthatóak. A csillaggal (\*) jelzett vegyületek fémkomplexek. Türk és mtsi. *Cancer Res* 2009; 69: (21), 8293-8301.

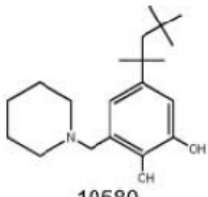
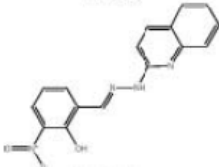
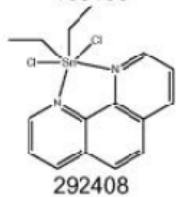
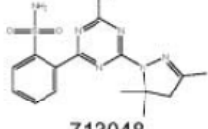
#### **4.1.4 Az MDR-szelektív aktivitás ABCB1 funkció-függésének vizsgálata specifikus transzporter inhibitor alkalmazásával**

Annak megerősítésére, hogy a validált 22 MDR-szelektív vegyület ABCB1 transzporter jelenlétében kiváltott fokozott toxicitása valóban a transzporter működésének következménye, további kísérleteket végeztünk. Az elegendő mennyiségben rendelkezésünkre álló molekulák közül négy, különböző szerkezeti motívummal rendelkező vegyületet választottunk ki (NSC168468: kinolin, NSC292408: az 1,10-fenantrolin ón komplexe, NSC10580: benzokinon, NSC713048: triazin származék), és vizsgáltuk citotoxikus hatásukat további multidrogtoleráns sejtvonalakon.

A doxorubicin szelekcióval létrehozott humán MDR sejtvonal, a MES-SA/Dx5, méhszarkóma eredetű. Két izogenikus sejtvonalpárt is használtunk. A humán ABCB1 cDNS-ével transzfektált NIH-MDR1-G185 egér fibroblaszt sejtvonal, az A431-B1, mely lentivirális transzdukcióval készült, humán epidermoid karcinóma eredetű. A négy MDR-szelektív vegyület mind a három sejtvonalpáron fokozott toxicitást mutatott a transzportert overexpresszáló sejteken, ami azt bizonyítja, hogy a szelektív tulajdonság nem korlátozódik a KB-3-1/KBV1 sejtvonalpárra, hanem szöveti eredettől és az MDR tulajdonság eredetétől függetlenül, csak az ABCB1 kifejeződésétől függ (4. táblázat).

A vegyületek szelektivitási arányai ( $IC_{50}^{parentális}/IC_{50}^{MDR}$ ) a különböző sejtvonalpárokon eltérőek voltak (4. táblázat), ami valószínűleg a sejtek különböző szöveti eredetével magyarázható.

Az ABCB1 specifikus, nagy affinitású inhibitora, a PSC833 alkalmazásával vizsgáltuk, hogy az vegyületek szelektív aktivitása függ-e a transzporter működésétől. A gátlószer jelenlétében a KB-V1 sejtvonal drogérzékenysége mind a 4 vegyület esetében jelentősen, a parentális KB-3-1 sejtek érzékenységének szintjére csökkent, ami arra utal, hogy az MDR-szelektív toxicitás valóban az ABCB1 transzporter funkciójától függ. Méréseink szerint az MDR sejtek ABCB1 funkciótól-függő túlérzékenységét az NSC73306 vegyületen [131] kívül tehát számos további általunk azonosított vegyület kiváltja.

NSC	KB-3-1/ KB-V1	KB-V1 (PSC)	NIH- 3T3/ G185	MES-SA/ MES-SA Dx5	A431/ A431 B1
 10580	1.71	2.20	4.27	4.78	4.32
 168468	3.82	2.87	3.10	3.82	1.43
 292408	2.80	3.20	1.77	3.50	4.13
 713048	1.71	4.90	3.98	5.06	2.18

**4. táblázat:** Az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott fokozott toxicitás ABCB1 expresszió- és funkciófüggése. Az NSC10580, az NSC168468, az NSC292408 és az NSC713048 MDR-szelektív aktivitását a parentális sejtvonalakon (KB-3-1, NIH-3T3, MES-SA és A431) és a hozzájuk tartozó ABCB1-et overexpresszáló sejtvonalakon (KB-V1, NIH-MDR1-G185, MES-SA/Dx5, A431-B1) kiváltott citotoxicitás összehasonlításával, MTT esszével határoztuk meg. A számok a vegyületek adott sejtvonalpárok mutatott szelektivitási arányát jelzik ( $IC_{50}^{KB-3-1} / IC_{50}^{KB-V-1}$ ). Az 1-nél nagyobb hányados az MDR-szelektív aktivitást jelzi. Türk és mtsi. Cancer Res 2009; 69: (21), 8293-8301.

#### 4.1.5 Az MDR-szelektív aktivitás ABCB1 funkció-függésének elemzése az ATP-áz deficiens, “Walker A” mutáns transzporter vizsgálatával

##### 4.1.5.1 “Walker A” mutáns ABCB1 transzportert overexpresszáló stabil sejtvonalak létrehozása

Az ABCB1 specifikus inhibitorainak (PSC833, XR9576) jelenlétében eredményeink szerint az MDR-szelektív vegyületek fokozott toxicitása megszűnt, arra utalva, hogy a szelektivitás kiváltásában a transzporter ATP-t hidrolizáló aktivitásának, vagy szubsztrátokat mozgó efflux funkciójának alapvető szerepe van.

Az újonnan azonosított MDR-szelektív vegyületeink esetében a transzporter-vegyület kölcsönhatásokról nem állt rendelkezésünkre információ, ezért elképzelhetőnek tartottuk, hogy a vegyületek ABCB1 fehérjéhez való kötődésének szerepe lehet a szelektív aktivitás kiváltásában. Az ABCB1-hez nagy affinitással kötődő inhibitor molekulák azon kívül, hogy gátolják a hidrolízis és az efflux folyamatait, gátolhatják az esetleges vegyület-transzporter kölcsönhatások kialakulását, ill. megváltoztathatják a fehérje lipidkörnyezetét is. Ezért annak bizonyítására, hogy a szelektív toxicitást valóban a transzporter működése, hidrolízishez kapcsolt efflux funkciója okozza, ATP-áz deficiens, funkcióképtelen ABCB1 mutánsokat kifejező sejtvonalakat hoztunk létre.

Mivel az ABC transzporterek nukleotid kötő doménjének "Walker A" motívuma (G-X-X-G-X-G-K-S/T) [71] (8.ábra, A panel) felelős az ATP megkötéséért, ahol az erősen konzervált lizin (K) aminosavmaradék nélkülözhetetlen az ATP-hidrolízishez [164], a lizint metioninra cserélve állítottam elő funkcióképtelen ABCB1 mutánsokat. A mutációt a transzporter N-terminális, C-terminális és mindkét oldali "Walker A" motívumaiban "site-directed" mutagenézissel létrehozva, három funkcióképtelen mutáns cDNS-t (K433M, K1076M és K433M/K1076M) hoztam létre.

A vad típusú és mutáns transzportereket stabilan overexpresszáló sejtvonalak létrehozásához a *Sleeping Beauty (SB)* transzpozon-alapú génbeviteli rendszert alkalmaztam. Az SB transzpozáz enzim aktivitásán alapuló mechanizmus a "promoter-cDNS kazettát" a sejtekbe juttatott transzpozon vektorból a genomba integrálja. A módszer előnye, hogy vírusmentes, biztonságos eljárás, mely alacsony transzfekciós hatékonyság esetén is magas és stabil fehérje expressziót eredményez emlős sejtekben [165]. A vad típusú és mutáns ABCB1 cDNS-eket tartalmazó SB2 transzpozon vektorokkal MDCK (Madin-Darby canine kidney) kutyavese sejteket transzfektáltam. A transzfektált sejtpopulációból az ABCB1-et kifejező sejtek kiválogatásához áramlási citometriás (FACS, fluorescence activated cell sorting) szortolási eljárást alkalmaztunk, hogy elkerüljük az antibiotikumok toxikus hatásán alapú szelekciós folyamatokat, melyek befolyásolhatják az MDR transzporterek expressziós szintjét. Az ABCB1 fluoreszcens jelölésére a nem konformáció-szenzitív MRK16 monoklonális antitestet használtuk, mely kizárólag a humán ABCB1 fehérje extracelluláris epitópját ismeri fel.

Az MDCK sejtvonal MDR transzporterek funkcionális vizsgálatára kiválóan alkalmas sejtmódel, mivel a vese epitéliumsejtjeire jellemző egyrétegű növekedést (monolayer) és apikális-bazolaterális polarizációt mutat, sejtkapcsoló struktúrákkal lezárt

sejtréteget képezve. Így egyrészt ezek a sejtvonalak a továbbiakban alkalmasak lehetnek transzcelluláris transzportmérések és drogakkumulációs kísérletek végzéséhez is [76], másrészt a sejtek nem humán eredete biztosítja, hogy az alacsony mennyiségben kifejeződő endogén P-glikoprotein expresszió az ABCB1 pozitív sejtek áramlási citométerrel történő kiválogatása során a humán fehérjétől megkülönböztethető.

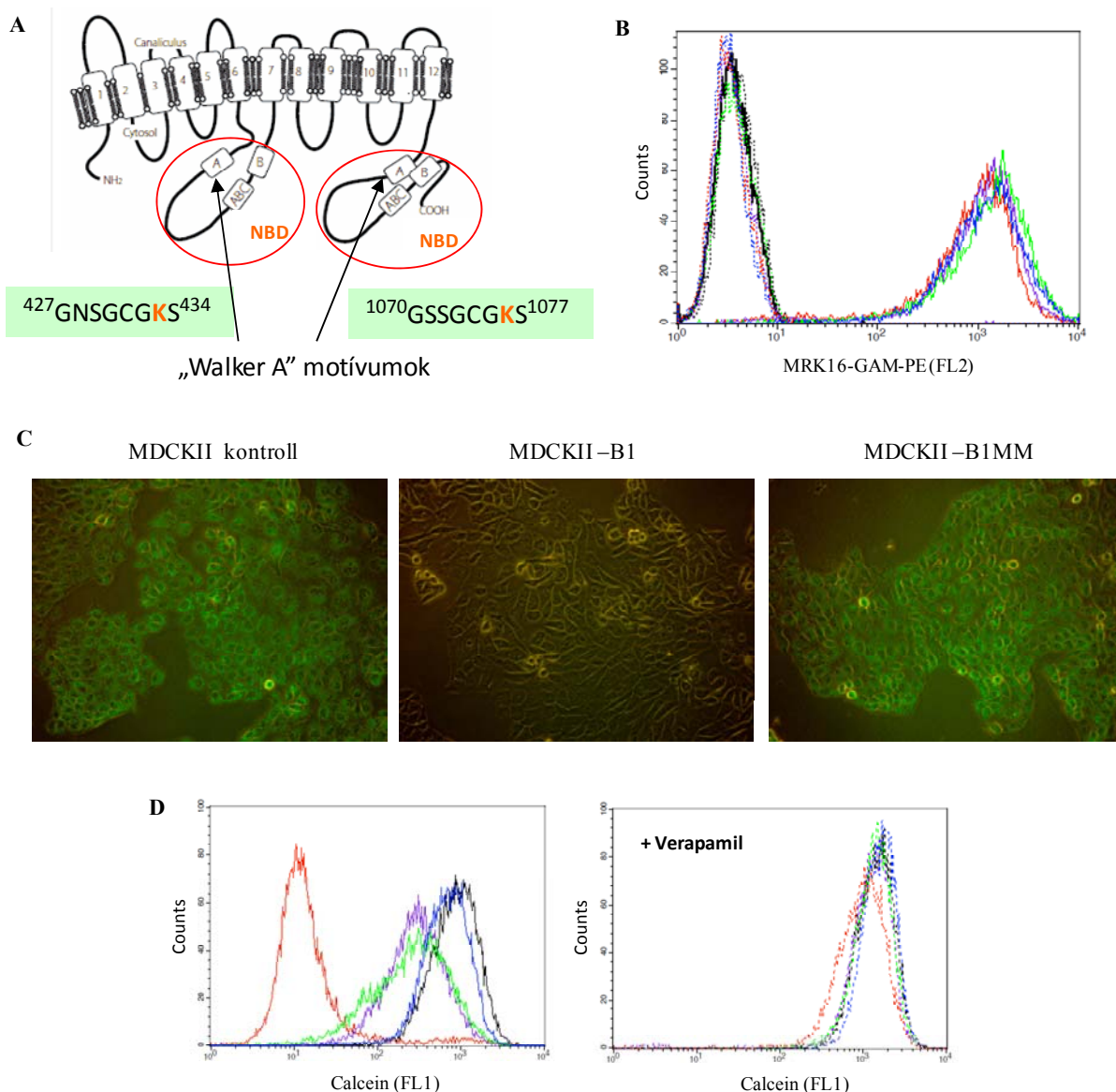
#### **4.1.5.2 A vad típusú és a “Walker A” mutáns ABCB1 transzportert overexpresszáló**

##### **MDCKII sejtvonalak fehérje expressziós és funkcionális jellemzése**

Mielőtt a vad típusú és az ATP-áz deficiens mutáns ABCB1 transzportert kifejező MDCKII sejtvonalaink MDR-szelektív vegyületekkel szemben mutatott érzékenységet, annak transzporter-funkciótól való függését megvizsgáltuk volna, ellenőriztük az új sejtvonalak transzporter expresszióját és funkcióját.

4 héttel az utolsó áramlási citométerrel végzett szortolás után a humán specifikus MRK16 antitesttel történő sejtfelszíni expresszió FACS analízise homogén és magas expressziót mutatott mind a vad típusú, mind a három mutáns fehérje esetében. A nem-specifikus jelölődést izotípus kontroll antitest alkalmazásával zártuk ki (8.ábra, B panel). Az expresszió szintje mind a 4 sejtvonal esetében azonos volt, ami lehetővé tette a vad típusú és a mutáns transzporterek funkciójának összehasonlítását.

Az ABCB1 transzporter funkcionális vizsgálatát calcein-AM (calcein-acetoxi-metil-észter) esszével végeztem, melyet nagy érzékenysége és megbízhatósága miatt a gyógyászatban diagnosztikai céllal is alkalmaznak [86]. Várakozásunknak megfelelően a vad típusú transzporter kifejeződése alacsony calcein akkumulációt eredményezett a sejtekben (mivel a calcein-AM az ABCB1 szubsztrátja), és érzékeny volt a verapamil inhibitor jelenlétére. A transzfektálatlan sejtek magas calcein akkumulációja az inhibitor jelenlétében nem változott (8. ábra, D panel). A FACS analízissel mért calcein felvétel kvantifikálására ún. multidrog rezisztencia aktivitási faktort (MAF) számoltunk, mellyel a MDR transzporterek efflux aktivitása jól jellemezhető és különböző sejtvonalak között összehasonlítható [156]. Az MDCKII-B1 sejtvonal és a doxorubicin szelekcióval létrehozott MES-SA/Dx5 sejtvonal MAF értékei hasonlóan magasak voltak (MDCKII-B1:  $96,86 \pm 1,52\%$ ; MES-SA/Dx5:  $97,76 \pm 0,85\%$ ), ami azt mutatja, hogy a két MDR sejtvonal ABCB1-mediált efflux kapacitása hasonló mértékű.



**8. ábra:** ATP-áz deficiens „Walker A” mutáns ABCB1 transzportereket kifejező MDCKII sejtvonalak transzporter expressziójának és funkciójának jellemzése. Az ABCB1 N- ill. C-terminális „Walker A” mutánsait (K433M ill. K1076M) kifejező MDCKII-B1K433M ill. MDCKII-B1K1076M, és a kétoldali mutáns K433M/K1076M fehérjét kifejező MDCKII-B1MM sejtvonalakat állítottunk elő. A sejtvonalak ABCB1 transzporter expresszióját és funkcióját jellemeztük. A) Az ABCB1 fehérje doménszerkezetének sematikus ábrázolása, a nukleotid kötő domének (NBD, nucleotide binding domain), ezen belül a „Walker A” motívumok feltüntetésével. Az aminosavszekvenciában sárgával jelöltük a metioninra mutált lizin aminosavat (K). B) A sejtfelszíni ABCB1 expresszió meghatározása MRK16 antitestek jelöléssel (FACS). A hisztogramon a pontozott vonalak az izotípus antitesttel végzett kontroll jelölések eredményeit mutatják. A vízszintes tengely az antitesttel jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitását, a függőleges tengely az adott intenzitásokhoz tartozó sejt számot mutatja. Színkódok: (fekete) transzfektálatlan MDCKII, (vörös) MDCKII-B1, (kék) MDCKII-B1MM, (lila) MDCKII-B1K433M, (zöld) MDCKII-B1K1076M sejtvonalak. C) A fénymikroszkópos felvételek a sejtek rhodamin123 akkumulációját mutatják (zöld fluoreszcencia). Mivel a vegyület a mitokondriumokban feldúsul, a



*sejtmagok fluoreszcencia intenzitása alacsonyabb. Az MDCKII-B1 sejtek nem veszik fel a rhodamint. D) Az ABCB1 transzporter funkciójának vizsgálata calcein akkumulációs esszével (FACS). Bal oldali hisztogram: a sejtek calcein felvétele verapamil gátlószer nélkül. Jobb oldali hisztogram: a sejtek calcein felvétele 10 $\mu$ M verapamil gátlószer jelenlétében (pontosított vonalak). A vízszintes tengely a sejtekben akkumulálódott calcein fluoreszcencia intenzitását, a függőleges tengely az adott intenzitásokhoz tartozó sejtszámot mutatja. Színek: (fekete) transzfektálatlan MDCKII, (vörös) MDCKII-B1, (kék) MDCKII-B1MM, (lila) MDCKII-B1K433M, (zöld) MDCKII-B1K1076M sejtvonalak.*

A kétoldali “Walker A” mutáns, ATP-áz deficiens transzportert (K433M/K1076M) kifejező MDCKII-B1MM sejtek a nem transzfektált sejtekkel megegyező, magas calcein felhalmozódást mutattak, ami az ABCB1 ATP-áz funkciójának teljes elvesztését igazolta. Az irodalmi adatok alapján az N- és C-terminális mutánsok (K433M és K1076M) esetében hasonló eredményre számítottunk, de többszöri mérés során is a sejtek kismértékben csökkent calcein akkumulációját figyeltük meg az MDCKII-B1MM sejtekhez képest. Mivel a kismértékű különbség az inhibitor jelenlétére érzékeny volt, vizsgálni kezdtük a jelenséget, amely arra utalt, hogy az egyoldali mutáns fehérjék reziduális szubsztrát-stimulált ATP hidrolizáló aktivitással és ehhez kapcsolódóan részleges efflux funkcióval rendelkezhetnek. Kollaborációs együttműködésben született eredményeink az ATP kötést és hidrolízist a szubsztrát transzporttal összekötő konformációváltozás nyomonkövetésével igazolták elképzelésünket. (A kézirat előkészületben)

A kétoldali mutáns (K433M/K1076M) transzporterfunkciójának hiányát és a vad típusú ABCB1 erős efflux aktivitását BODIPY-prazozin és rhodamin123 akkumulációs esszékkel (ABCB1 szubsztrátok) is megerősítettük (8. ábra, C panel).

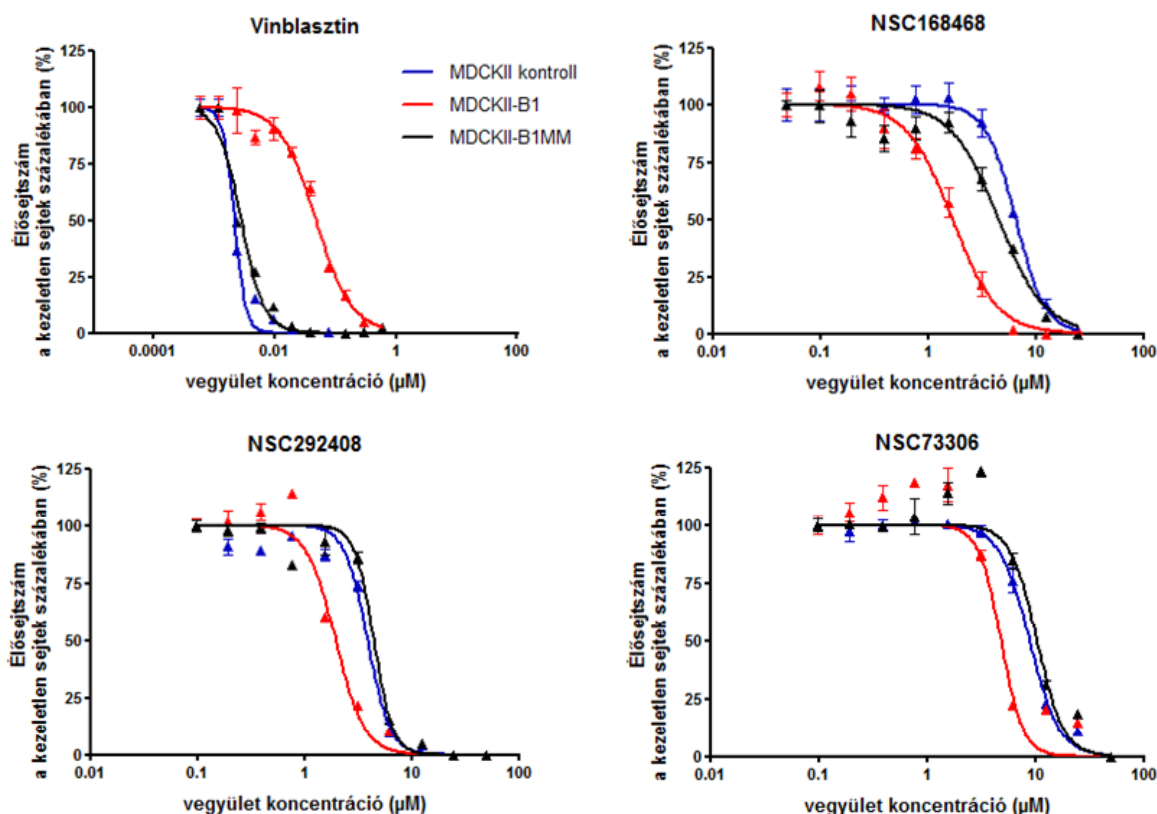
#### **4.1.5.3 Az MDR-szelektív vegyületek ABCB1 funkció-függő aktivitásának vizsgálata**

##### **ATP-áz deficiens, funkcióképtelen mutáns transzportert kifejező sejteken**

Újjonnan létrehozott sejtvonalainkon a citotoxicitási vizsgálatokat a multidrog rezisztens fenotípus vizsgálatára vinblasztin érzékenység elemzésével kezdtük. A magas és funkcionális ABCB1 expresszióval rendelkező MDCKII-B1 sejtek 20-szoros vinblasztin-rezisztenciát mutattak a transzfektálatlan kontroll MDCKII sejtvonalhoz képest (szelektivitási arány:  $0,05 \pm 0,005$ ) (9. ábra). A funkcióképtelen K433M/K1076M mutáns esetében az MDCKII-B1MM sejtek érzékenysége megegyezett a transzportert nem kifejező, transzfektálatlan MDCKII sejtek érzékenységével. Összességében, az újjonnan létrehozott multidrog rezisztens MDCKII-B1 és a drogérzékeny MDCKII-B1MM sejtvonalak alkalmasnak bizonyultak az MDR-szelektív toxicitás vizsgálatára, melyet

először vizsgálhattunk meg a vad típusú fehérjétől mindössze 2 aminosavban eltérő, funkcióképtelen ABCB1 mutáns overexpressziója mellett.

Kísérleteinkben az NSC168468, NSC292408 és az NSC73306 vegyületek citotoxikus hatását vizsgáltuk, melyek aktivitását az előzőekben ABCB1 inhibitor jelenlétében is elemeztük. A vegyületek minden esetben fokozottabb toxicitást mutattak a vad típusú ABCB1 kifejeződése esetén az MDCKII-B1 sejtvonalon a kontroll MDCKII sejtekhez viszonyítva. Tehát molekuláink ezen az izogenikus sejtvonalpáron is MDR-szelektívnek bizonyultak (szelektivitási arány: NSC168468: 3,86; NSC292408: 1,94; NSC73306: 1,81) (9. ábra). Ezzel szemben a funkcióképtelen transzporter jelenlétében (MDCKII-B1MM sejtvonal) a sejtek nem mutattak megnövekedett érzékenységet. Az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott toxicitás mértéke a kontroll sejtekéhez volt hasonló. Eredményeink megerősítették feltételezésünket, miszerint az ABCB1 transzporter magas expressziója önmagában nem vált ki szelektíven megnövekedett toxikus hatást, a vegyületek fokozott aktivitása a transzporter efflux és/vagy ATP hidrolizáló funkciójához köthető.



**9. ábra: MDR-szelektív vegyületek citotoxikus hatásának vizsgálata funkcióképtelen ABCB1 mutáns transzporter jelenlétében.** A parentális MDCKII, a vad típusú ABCB1-et overexpresszáló MDCKII-B1, és a funkcióképtelen, ATP-áz deficiens K433M/K1076M mutáns ABCB1-et overexpresszáló MDCKII-B1MM sejtvonalak érzékenységet az MDR-szelektív vegyületekkel és a vinblasztinnal szemben 3 napos citotoxicitási (MTT) esszével határoztuk meg. Reprezentatív MTT esszék. Az ábrák az élősejtszámot mutatják a droggal nem kezelt sejtek élősejtszámahoz viszonyítva, százalékban. Az MTT esszéket 3 párhuzamossal végeztük, az ábrák a relatív élősejtszám átlagát és szórását, ill. a mérési pontokra illesztett nem-lineáris dózis-válasz görbéket mutatják.

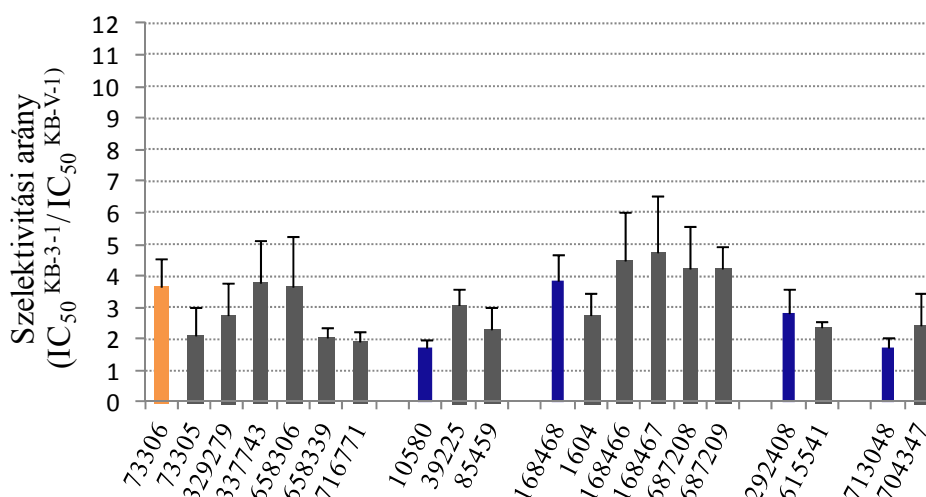
#### 4.1.6 MDR-szelektív vegyületek azonosítása kémiai szerkezeti hasonlóság alapján

Mivel a validált MDR-szelektív vegyületek között kémiai szerkezetükben koherens alcsoportokat azonosítottunk (tioszemikarbazonok, 8-hidroxi-kinolinok, 1,10-fenatrolin-fém komplexek, benzokinon vegyületek), azt feltételeztük, hogy a szerkezeti hasonlóságon alapuló keresés újabb szelektív toxicitású molekulákat azonosíthat. Ezért a fentebb MDR-szelektív tulajdonságaikban részletesebben jellemzett 4 vegyület (NSC168468, NSC292408, NSC10580, NSC713048) ill. az NSC73306 közeli struktúrális analógjait kerestük a DTP vegyülettárában. Tanimoto koeficiensek alapján, a távolság küszöbértékét 0,6-re állítva, 77 analógot azonosítottunk, melyek közül 58 volt elérhető. A KB-V1 és KB-3-1 sejtvonalpáron végzett citotoxicitási esszék 15 újabb

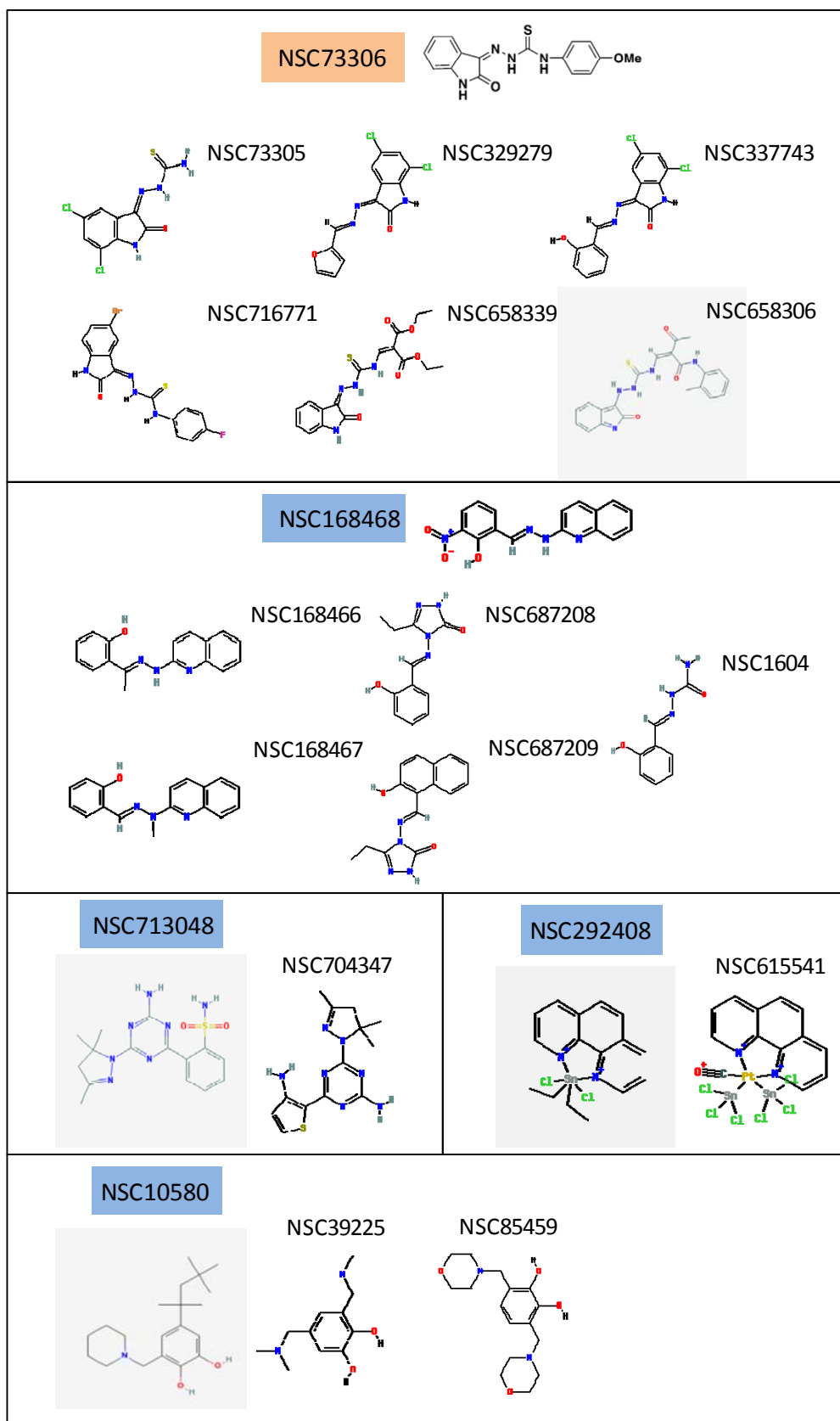
MDR-szelektív vegyületet azonosítottak, melyek toxicitása az ABCB1 transzportert kifejező sejtvonalon fokozottabb volt (10 és 11. ábrák).

Összességében azzal a megközelítéssel, mely az ABCB1 transzporter mRNS expressziójának és a vegyületek toxikus aktivitásának korrelációs analízisén és a kémiai hasonlósági keresésen alapult, 37 MDR-szelektív vegyületet azonosítottunk, ami a már ismert NSC73306-on kívül 36 új molekula leírását jelentette.

Az a megfigyelés, miszerint a hasonlósági keresés mindegyik vizsgált strukturális alapmotívum esetében azonosított szerkezetileg rokon MDR-szelektív molekulákat, feltételezésünk szerint a kémiai szerkezet és a funkcionáló ABCB1-re szelektív toxicitás lényegi összefüggésére utal.



**10. ábra: Kémiai szerkezeti hasonlóság alapján azonosított további MDR-szelektív vegyületek szelektív toxicitásának mértéke a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpáron.** A Tanimoto szerkezeti hasonlósági kereséssel azonosított 15 MDR-szelektív vegyület szelektív citotoxicitását jellemző  $IC_{50}^{KB-3-1} / IC_{50}^{KB-V-1}$  hányadosok. A DTP vegyülettárából korrelációs analízissel általunk azonosított, a hasonlósági keresés alapját képező 4 vegyületet kék színnel, az új vegyületeket szürkével jelöltük. A DTP-ből elsőként azonosított NSC73306-ot, melyre szintén végeztünk hasonlósági keresést, narancssárga színnel jelöltük. A számok a vegyületek NSC azonosítói. Az 1-nél nagyobb hányados az MDR-szelektív aktivitást jelzi, miszerint a vegyület az ABCB1-et kifejező sejteket hatékonyabban pusztítja.



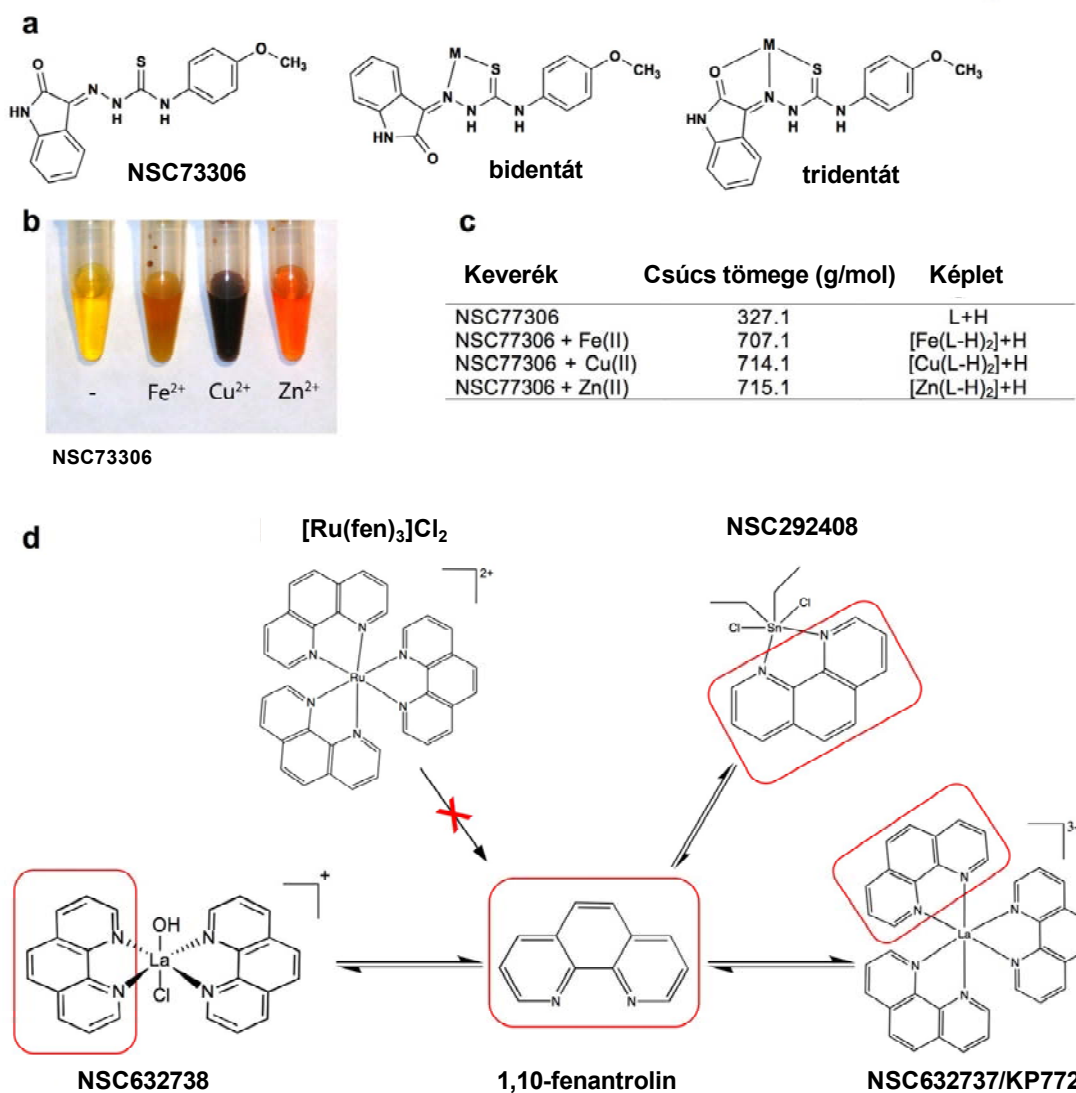
11. ábra: A hasonlóság-alapú kereséssel azonosított 15 MDR-szelektív vegyület kémiai szerkezete. Az NSC73306, NSC10580, NSC168468, NSC292408 és NSC713048 vegyületek

*Tanimoto hasonlósági kereséssel azonosított és validált szerkezeti analógjai, melyek MDR-szelektív aktivitást mutatnak. A kémiai szerkezeteket a (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) adatbázisából töltöttük le. Vörös: oxigén, kék: nitrogén, zöld: klór, sárga: kén vagy platina, szürke: ón, fekete: hidrogén.*

#### **4.1.7 A fémion kötés MDR-szelektív aktivitásban betöltött szerepének vizsgálata**

Mivel számos ismert keláló struktúra és fémkomplex bizonyult MDR-szelektív vegyületnek, lehetségesnek tartottuk, hogy a vegyületek fémion kötési képessége, ill. a fémkomplexek aktivitása felelős a vegyületek intracelluláris hatásáért. Mivel a fémkomplex képződés egyensúlyi folyamat, a komplexet felépítő valamennyi komponensnek (fémion, ellenion, szabad ligandum) ill. magának a komplexnek is szerepe lehet a kiváltott toxicitásban. Először az NSC73306 fémionkötési képességét vizsgáltuk meg. (Az NSC73306 ligandum fémionkötési képességének vizsgálata szerzőtársam, Matthew D. Hall munkája.)

Mindhárom +2 oxidációs állapotú fémion ligandumhoz való hozzáadása azonnali színreakciót okozott, ami a gyors fémkomplex képződésre utal (12. ábra). Az NSC73306 ligandum fémionkötésének két lehetséges, bidentát és tridentát formáját a 12. ábra mutatja. Bidentát esetben a koordinációs kötések a N és a S atomok, tridentát esetben a N, S és az O atomok létesítik a fémionnal. Az electrospray ionizációs tömegspektrometriás eredmények az NSC73306 vassal, cinkkel, rézzel képzett komplexeinek esetében is 2:1 ligandum/fémion moláris arányú komplexeket mutattak ki, melyekben az NSC73306 deprotonált formában volt jelen (12. ábra).



**12. ábra: A tioszemikarbazon NSC773306 és az 1,10-fenantrolin ligandumok fémkomplek-képzése.** A) A tioszemikarbazon NSC773306 többféle módon alakíthat ki koordinációs kötéseket fémionnal, ezek közül legvalószínűbb a bidentát és tridentát kötés. B) Az NSC773306 oldat színváltozása a fémszulfátok hozzáadása után. C) Az NSC773306 (L; M=326,1 g/mol) és +2 oxidációs számú fémkeverékeinek analízise electrospray ionizációs tömegspektrometriával. A táblázat az 1:1 arányú metanol/víz elegyben meghatározott legmagasabb tömegcsúcsokat mutatja, mely minden esetben 2:1 ligandum/fémion arányú komplexnek felel meg. D) Az 1,10-fenantrolin ligandumot tartalmazó NSC292408 és NSC632737, NSC632738 fémkomplexek disszociálásra képesek, míg a nagyon stabil ruténium komplexből nem szabadulhatnak fel fenantrolin ligandumok, ezért utóbbi vegyület nem mutat MDR-szelektív toxicitást. *Türk és mtsi. Cancer Res 2009; 69: (21), 8293-8301.* Az NSC773306 ligandum fémion-kötési képességének vizsgálata szerzőtársam, Matthew D. Hall munkája.

Azért, hogy megvizsgáljuk az NSC73306 ligandum, fémkomplexeinek és a fémionoknak a citotoxicitásában és annak szelektivitásában betöltött szerepét, MTT esszéket végeztünk a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpáron. A fémionok önmagukban egyik esetben sem mutattak toxikus hatást,  $IC_{50}$  értékük  $100\mu\text{mol/L}$ -nél magasabb volt. Az NSC73306 rézzel való komplexálása nagymértékben megnövelte a ligandum toxicitását függetlenül az ABCB1 jelenlététől, 6 ill. 7-szeres  $IC_{50}$  csökkenést okozva, és egyúttal megszüntette az MDR-szelektív aktivitást is (5. táblázat). Az NSC73306 ligandumhoz viszonyítva a cink komplex esetében csak a toxicitás kismértékű csökkenését tapasztaltuk, míg a szelektivitási arány változatlan maradt. A vassal való komplexálás viszont felére csökkentette az NSC73306 szelektív aktivitását. Ebben az esetben az ABCB1-et overexpresszáló sejtvonaltól érzékenysége harmadrésztére csökkent, míg a parentális sejtvonaltól  $IC_{50}$  értéke csak 1,5-szeresére nőtt.

A NSC73306 exogén Fe(II) jelenlétében mutatott toxicitás csökkenése arra utal, hogy a vas depléciónak szerepe lehet a ligandum által kiváltott toxicitásában, illetve a szelektivitás kiváltásában is. Mivel a szelektivitási arány egyik fémkomplex esetében sem növekedett meg, feltételezhető, hogy nem a komplexek aktivitása felelős az MDR-szelektív toxicitás kiváltásáért.

Mivel a DTP vegyülettárából négy 1,10-fenantrolin-fém komplexet ( $Nb^{3+}$ ,  $Ce^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ) is azonosítottunk, megvizsgáltuk a szabad ligandum toxicitását is. Heffeter és kollégáinak megfigyelésével összhangban, akik egy lantán tartalmú 1,10-fenantrolin komplex, a KP772 ABCB1 jelenlétében megnövekedett toxicitását írták le, a vegyületet a DTP vegyülettárából korrelációs analízisünk is azonosította (NSC632737) [166]. Az 1,10-fenantrolin ligandum önmagában is MDR-szelektívnek bizonyult (5. táblázat), ami megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a fémkomplexek esetében is a disszociált ligandum aktivitása felelős az ABCB1 funkciótól függő szelektivitásért. Egy különösen stabil 1,10-fenantrolin komplex, a  $Ru[(1,10\text{-fenantrolin})_3]Cl_2$  toxikus hatásának vizsgálata is ezt erősítette, mivel mindkét sejtvonalon inaktívnak bizonyult (5. táblázat).

Összességében eredményeink azt a hipotézist támogatják, miszerint az MDR-szelektív vegyületeként azonosított fémkomplexek szelektív aktivitása az intracellulárisan felszabaduló, fémion kötésre képes ligandumok aktivitásán alapul. További kísérletek szükségesek annak meghatározására, hogy a keláló képességű ligandumok egy sejtélettani szempontból fontos fémion (pl.vas) deplécióján, fémion tartalmú enzimek gátlásán, vagy



bizonyos fémionokkal sejten belül képzett komplexeik révén fejtik ki szelektív toxikus hatásukat.

Vegyület	KB-V1 IC <sub>50</sub> (μM)	KB-3-1 IC <sub>50</sub> (μM)	Szelektivitási arány
<b>Kelátorok</b>			
NSC73306	3,3 ± 1,3	14,2 ± 1,2	4,30
1,10-fenantrolin	1,16 ± 0,16	4,04 ± 0,19	3,50
Deferrioxamin	43,1 ± 8,6	0,75 ± 0,12	0,02
Triapin	5,9 ± 2,6	1,4 ± 2,5	0,20
<b>1,10-fenantrolin</b>			
KP772	-	-	2,00*
[Ru(fen) <sub>3</sub> ]Cl <sub>2</sub>	>50	>50	-
K.SCN	>50	>50	-
[NdCl <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> )(fen)]Cl <sub>2</sub>	1,05 ± 0,66	7,73 ± 2,87	2,80
<b>NSC73306</b>			
Fe(II)-NSC73306	10,2 ± 0,9	19,6 ± 2,6	1,90
Cu(II)-NSC73306	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,1	1,00
Zn(II)-NSC73306	4,8 ± 1,7	20,8 ± 5,4	4,30
Fe <sup>2+</sup>	>100	>100	-
Cu <sup>2+</sup>	>100	>100	-
Zn <sup>2+</sup>	>100	>100	-

**5. táblázat: MDR-szelektív ligandumok és fémkomplexeik citotoxikus aktivitása a KB-3-1 és az ABCB1 transzportert overexpresszáló KB-V1 sejtvonalakon.** A KB-3-1 és KB-V1 sejteken 3 napos MTTesszéssel meghatározott IC<sub>50</sub> értékek, és az ezekből számolt szelektivitási arányok ( $IC_{50}^{KB-3-1}/IC_{50}^{KB-V1}$ ). Az 1-nél kisebb szelektivitási arány a KB-V1 sejtek rezisztenciáját, az 1-nél nagyobb hányados ezen sejtek fokozott érzékenységet jelenti. Az NSC73306 Fe(II), Cu(II) és Zn(II) komplexeit vas-, réz- és cinkszulfáttal történő előinkubálással állítottuk elő. \* a szelektivitási arányt Heffeter és kollégáinak munkájából [166] vettük át, mert a vegyület nem volt elérhető. *Türk és mtsi. Cancer Res 2009; 69: (21), 8293-8301.*

#### 4.2 Az MDR-szelektív vegyületek citotoxikus hatásának vizsgálata az ABCG2 multidrog transzporter jelenlétében

Az általunk azonosított NSC292408 MDR-szelektív vegyülethez hasonló kémiai szerkezettel rendelkező (1,10-fenantrolin-fém komplex) KP772 szelektív toxicitását Heffeter és kollégái nemcsak az ABCB1-et, hanem az ABCG2 multidrog transzportert kifejező MDR sejteken is leírták [166]. Az új jelenséget, az ABCG2 szelektív érzékenyítő

hatását a transzporterrel transzfektált sejtvonalon, azaz izogenikus kontroll sejtvonalhoz hasonlítva vizsgálták.

A KP772 vegyülethez hasonló kémiai struktúrájú NSC292408 mellett további három, eltérő kémiai szerkezetű részletesebben jellemzett MDR-szelektív vegyület citotoxikus hatását is megvizsgáltuk a lentivirális transzdukcióval létrehozott, ABCG2-t overexpresszáló A431-G2 humán epidermoid karcinóma sejtvonalon.

A sejtvonal funkcionális ABCG2 expresszióját citotoxicitási esszében ellenőriztük (13. ábra, A és B panelek). A kontroll, transzfektálatlan sejtekhez képest az A431-G2 sejtvonal 20-szoros mitoxantron (ABCG2 szubsztrát) rezisztenciát mutatott. A specifikus ABCG2 inhibitor FTC (fumitremorgin C) jelenlétében a rezisztencia nem alakult ki, az érzékenység a kontroll sejtekéhez hasonló volt, ami igazolta a transzporter működése által kiváltott mitoxantron rezisztenciát.

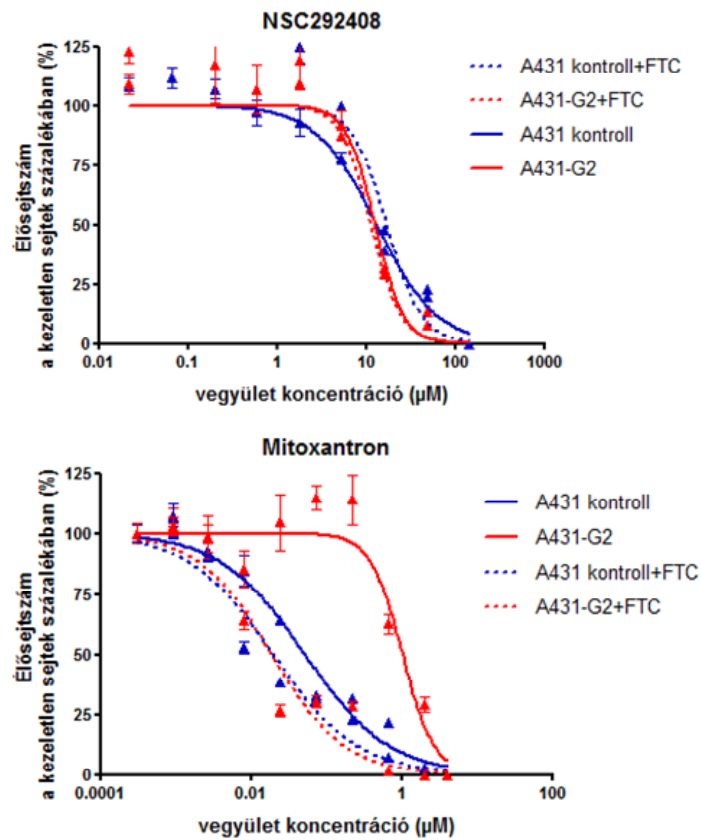
A citotoxicitási vizsgálatok alapján MDR-szelektív vegyületeink egyik esetben sem mutattak fokozott toxicitást az A431-G2 sejtvonalon a kontroll sejtekhez képest (13. ábra, A panel). A funkcionáló ABCG2 transzporter a tumorsejtek érzékenységét nem befolyásolta, vegyületeink jelenléte sem rezisztenciát, sem fokozott érzékenységet nem váltott ki. Ezenkívül az ABCG2-t kifejező sejtek érzékenységét vegyületeinkkel szemben az FTC jelenléte sem befolyásolta (13. ábra, B panel). Kísérleteinket egy további transzfektált sejtvonalon (MDCKII-G2) is elvégeztük, hogy kizárjuk az esetleges sejtvonal-specifikus hatást, de itt is hasonló eredményt kaptunk (az adatok nincsenek bemutatva).

MDR-szelektív vegyületeink fokozott toxikus hatása eredményeink szerint specifikus az ABCB1 transzporter működésére.

A

Vegyület	IC <sub>50</sub> (μM) A431 kontroll	IC <sub>50</sub> (μM) A431-G2	Szelektivitási arány
Mitoxantron	0,045±0,008	0,88±0,16	0,051 <sup>a</sup>
NSC10580	21,81±2,77	19,03±1,69	1,15 <sup>b</sup>
NSC168468	1,99±0,44	2,30±0,89	0,86 <sup>b</sup>
NSC292408	3,27±0,66	2,99±0,25	1,09 <sup>b</sup>
NSC713048	14,30±2,70	15,18±1,40	0,94 <sup>b</sup>

B



**13. ábra:** Az MDR-szelektív vegyületek citotoxikus hatásának vizsgálata az ABCG2 multidrog transzportert overexpresszáló A431-B1 sejtvonalon. A parentális A431 és az ABCG2 transzportert overexpresszáló A431-G2 sejtek mitoxantronnal és MDR-szelektív vegyületekkel szemben mutatott érzékenységet 3 napos citotoxicitási (MTT) esszében határoztuk meg. Az MTT esszében a toxikus vegyület által okozott élősejtszám csökkenést követjük a vegyület koncentrációjának függvényében, amit a nem kezelt sejtek élősejtszámához viszonyítva, százalékban kifejezve ábrázolunk. A) A mérési pontokra illesztett nem-lineáris dózis-válasz görbék alapján határoztuk meg a sejtek érzékenységét jellemző átlagos IC<sub>50</sub> értékeket és ezek szórását 3 független, 3 párhuzamossal végzett esszé alapján. A szelektivitási arány a két sejtvonal IC<sub>50</sub> értékeinek hányadosa ( $IC_{50}^{A431}/IC_{50}^{A431-G2}$ ), ahol az 1-nél kisebb érték az ABCG2-t kifejező sejtek rezisztenciáját, az 1-nél nagyobb érték az ABCG2 jelenlétében mutatott fokozott érzékenységet jelöli. A t-próba eredményét felső indexben jelöltük: „a”  $p < 0,05$ ; „b”  $p > 0,05$ . B)

*A mitoxantron és NSC292408 érzékenység ABCG2-funkciótól való függése. Az ABCG2 specifikus inhibitorát 10 $\mu$ M-os koncentrációban alkalmaztuk. Reprezentatív MTT esszék. Az ábrák az élősejtszámot mutatják a drogkoncentráció függvényében, a droggal nem kezelt sejtek élősejtszámához viszonyítva, százalékban kifejezve. Az MTT esszéket 3 párhuzamossal végeztük, az ábrák a relatív élősejtszám átlagát és szórását, ill. a mérési pontokra illesztett nem-lineáris dózis-válasz görbéket mutatják.*

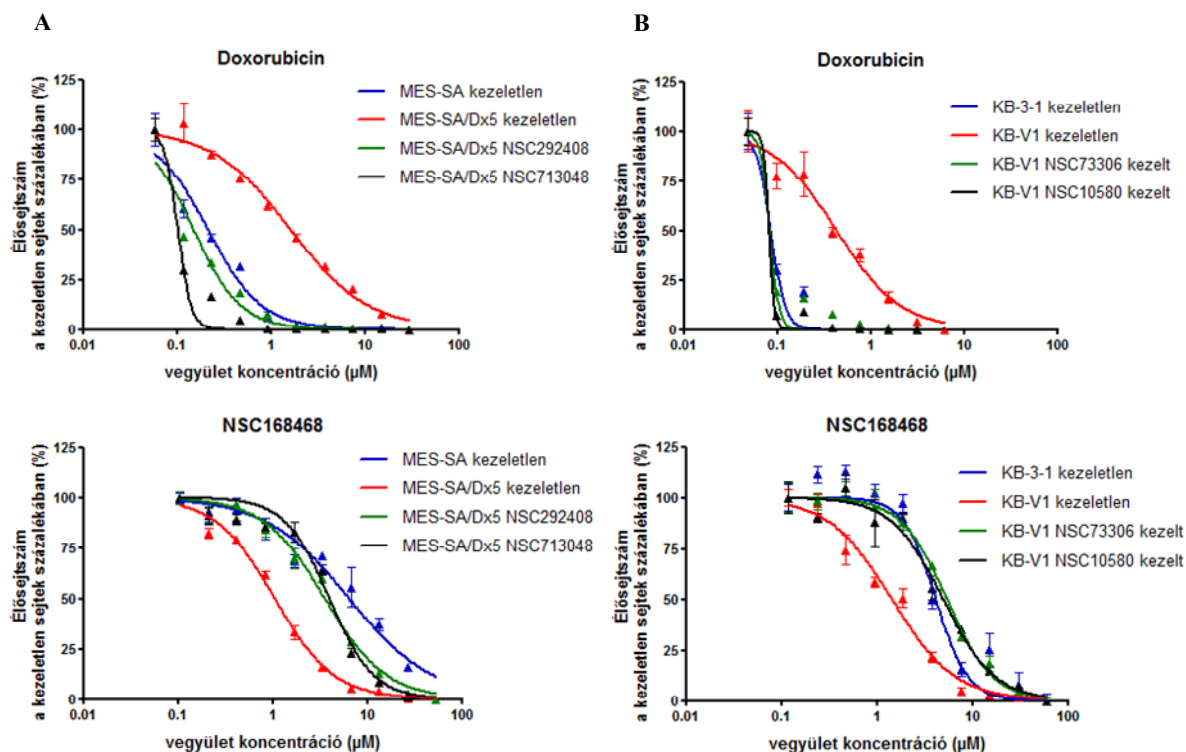
### **4.3 Az MDR-szelektív vegyületek hatása MDR tumorsejtvonalak drogérzékenységére és ABCB1 expressziójára**

#### **4.3.1 Az MDR tumorsejtvonalak MDR-szelektív vegyületekkel való hosszútávú kezelésének hatása a sejtek drogérzékenységére**

Eddigiekben bemutatott kísérleteinkben az MDR-szelektív vegyületek funkcionáló ABCB1 transzporter jelenlétében ill. hiányában mutatott toxikus aktivitásának különbségére fókuszáltunk, melyet 3 napos citotoxicitási esszékkel vizsgáltunk. A továbbiakban arra is kíváncsiak voltunk, hogy a vegyületekkel való drogkezelésnek milyen hatása van magára az ABCB1-et kifejező MDR sejtvonalra.

Ezért a 4 részletesebben vizsgált és különböző kémiai szerkezeteket reprezentáló MDR-szelektív vegyülettel (NSC168468, NSC292408, NSC10580, NSC713048) és az NSC73306-tal 3 hetes drogkezeléseket végeztünk a KB-V1 és a MES-SA/Dx5 tumorsejtvonalakon. A sejtvonalakat, melyeket idáig az MDR-szelektív vegyületek azonosítására és toxicitásuk jellemzésére használtunk, az MDR-szelektív vegyületek 3 napos citotoxicitási esszéiben meghatározott IC<sub>25</sub> koncentrációival kezeltük (a 75%-os élősejtszámhoz tartozó koncentrációérték). A kezelt és kezeletlen sejtvonalak doxorubicinnel és MDR-szelektív vegyületekkel szemben mutatott érzékenységét 1 héttel a drogkezelés befejezése után vizsgáltuk citotoxicitási esszéiben (14. ábra, A és B panelek). Érdekes módon a kezelt KB-V1 ill. MES-SA/Dx5 sejtvonalak doxorubicin rezisztenciája minden esetben megszűnt. Hasonlóképpen, a kezelt MDR sejtvonalak MDR-szelektív vegyületekkel szemben mutatott érzékenysége is a kontroll, ABCB1 transzportert nem kifejező sejtekéhez volt hasonló. Ez igaz volt nemcsak a kezeléshez használt vegyülettel szembeni viselkedésre, hanem általánosan is, tehát azok az MDR-szelektív vegyületek sem váltottak ki fokozott toxikus hatást, melyekkel az adott sejtvonalat nem kezeltük. A 3 hetes MDR-szelektív vegyületekkel való kezelés tehát revertáns sejtvonalakat hozott létre, mivel az idáig multidrog rezisztens sejtek újra a kontroll sejtekkel megegyező érzékenységet mutattak a kemoterápiás szer doxorubicinnel

szemben. Az eredmények felvetették a kezelés hatására kialakuló ABCB1 expresszió-csökkenés lehetőségét a revertáns MDR sejteken.



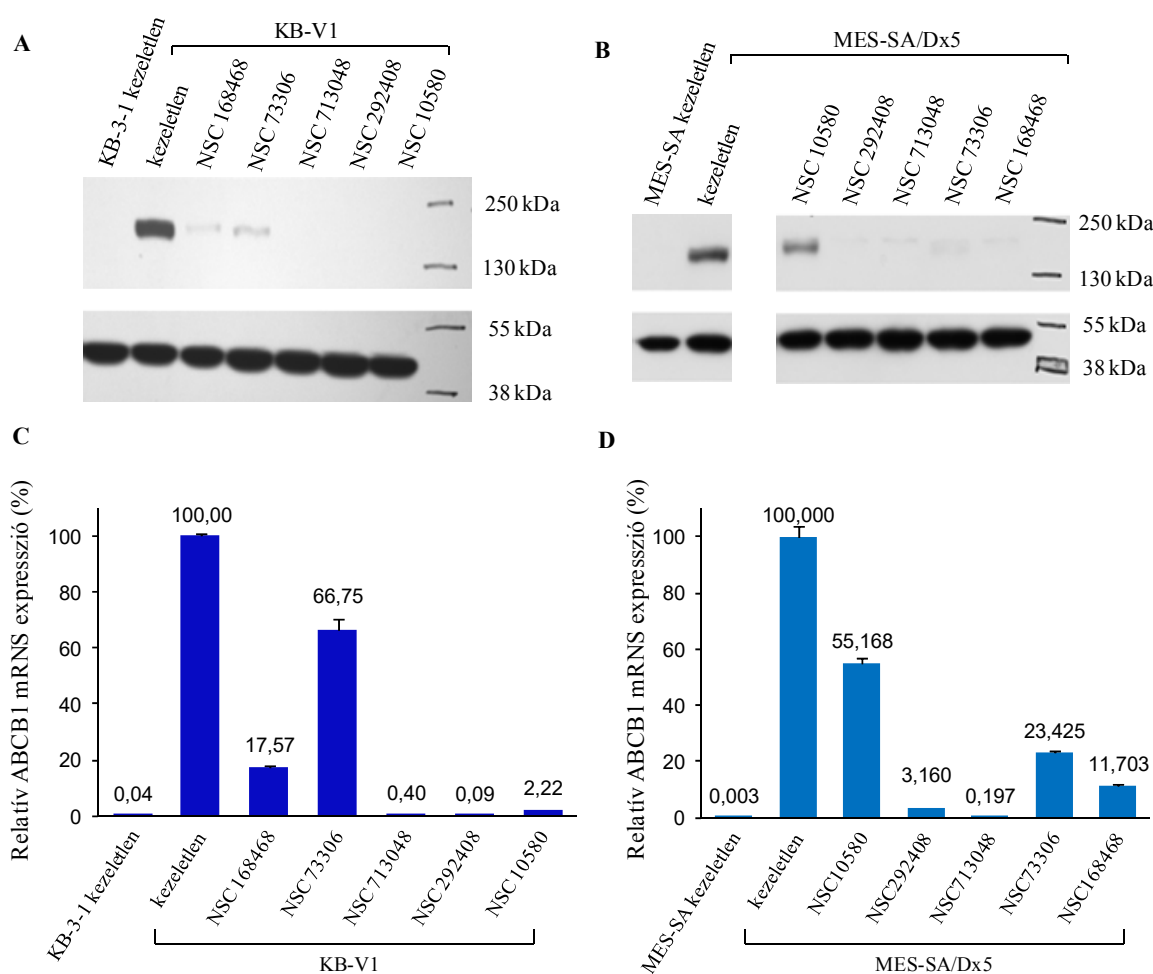
**14. ábra:** Az MDR-szelektív vegyületek hatása a multidrog rezisztens MES-SA/Dx5 és KBV1 sejtek doxorubicin és NSC168468 érzékenységre. A multidrog rezisztens KB-V1 és MES-SA/Dx5 sejteket 3 hétig kezeltük az MDR-szelektív vegyületek  $IC_{25}$  koncentrációjával. A KB-V1 sejtek esetében az NSC73306 és NSC10580 vegyületekkel kezelt sejtek érzékenységét (B), a MES-SA/Dx5 sejtek esetében az NSC292408 és NSC713048 kezelt sejtek érzékenységét (A) mutatjuk be. A kezeletlen (hatóanyaggal nem kezelt) sejteket csak a felhasznált vegyületek oldószerének, a dimetilszulfoxidnak (DMSO) azonos koncentrációjával kezeltük. A kezelt és kezeletlen sejtek doxorubicin és NSC168468 MDR-szelektív vegyületekkel szemben való érzékenységét 3 napos citotoxicitási (MTT) esszében határoztuk meg 1 héttel a drogkezelés befejezése után. Reprezentatív MTT esszék. Az ábrák az élősejtszámot mutatják a droggkoncentráció függvényében, a droggal nem kezelt sejtek élősejtszámához viszonyítva. Az MTT esszéket 3 párhuzamossal végeztük, az ábrák a relatív élősejtszám átlagát és szórását, ill. a mérési pontokra illesztett nem-lineáris dózis-válasz görbéket mutatják.

#### 4.3.2 Az MDR-szelektív vegyületek hatása az MDR sejtvonalak ABCB1 expressziójára

Az ABCB1 fehérje expresszióját a revertáns KB-V1 és MES-SA/Dx5 sejtvonalakon Western blot analízissel vizsgáltuk meg. A kezeletlen KB-V1 sejtvonal magas transzporter expressziót, a parentális, negatív kontrollként alkalmazott KB-3-1 sejtvonal a transzporter teljes hiányát mutatta (15. ábra, A panel). Az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt revertáns KB-V1 sejtvonalak mindegyikén drasztikus mértékű ABCB1 expresszió

csökkenést tapasztaltunk. Az NSC713048, NSC292408, és az NSC10580 vegyületekkel kezelt sejtvonalak esetében az ABCB1 fehérje expresszió Western blot analízissel nem volt kimutatható. Az NSC73306 és NSC168468 kezelések sejtvonalai alig detektálható, alacsony fehérjemennyiséget mutattak.

Hasonló eredményt kaptunk a revertáns MES-SA/Dx5 sejtvonalak fehérje expressziójának elemzésekor (15. ábra, B panel). Az 5 különböző MDR-szelektív vegyülettel kezelt revertáns sejtvonalból 4 esetben az ABCB1 expresszió detektálhatatlan szintre csökkent. Az NSC10580 esetében viszont csak kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk.



**15. ábra: Az MDR-szelektív vegyületek hatására bekövetkező ABCB1 fehérje és mRNA expresszió csökkenés.** A multidrog rezisztens KB-V1 és MES-SA/Dx5 sejteket 3 hétig kezeltük az NSC168468, NSC292408, NSC10580, NSC713048 ill. az NSC73306 MDR-szelektív vegyületek IC<sub>25</sub> koncentrációjával. A kezelés után a sejtek ABCB1 összefehérje mennyiségét Western blottal határoztuk meg a KB-V1 (A) és a MES-SA/Dx5 (B) sejtek esetében. A kezeltelen (hatóanyaggal nem kezelt) sejteket csak a felhasznált vegyületek oldószerének, a dimetil-

*szulfoxidnak (DMSO) azonos koncentrációjával kezeltük. A humán ABCB1 fehérje 170kDa, a kontroll  $\beta$ -aktin 42kDa. Real-time PCR-rel vizsgáltuk a KB-V1 (C) ill. a MES-SA/Dx5 (D) sejtek relatív ABCB1 mRNS expresszióját a kezelés befejezése után. A bemutatott eredmények esetében a relatív ABCB1 mRNS expressziót a  $\beta$ -aktin háztartási gén mRNS expressziójához való normalizálással,  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel határoztuk meg, a kezeletlen KB-V1 ill. MES-SA/Dx5 sejtek ABCB1 mRNS expressziójához viszonyítva, százalékban. Az eredmények (C és D) reprezentatív kísérletet mutatnak be, ahol a 3 technikai paralell átlagát és szórását ábrázoltuk, az átlagértékeket az oszlopok fölött feltüntettük.*

Mivel kíváncsiak voltunk, hogy a viszonylag rövid időn belül bekövetkező nagymértékű ABCB1 fehérje szint csökkenést esetleg a fehérje bomlásának felgyorsulása, vagy az mRNS szint csökkenése okozza, real-time PCR-rel határoztuk meg a revertáns sejtvonalak ABCB1 mRNS expresszióját. Az exon-exon határon átívelő PCR ampikon és taqman próba segítségével total RNS izolálás és cDNS átírás után vizsgáltuk meg az ABCB1 relatív mRNS expresszióját két „housekeeping” (háztartási) gén, a  $\beta$ -aktin, majd a  $\beta$ 2-mikroglobulin expressziójához való normalizálással is.

A taqman esszék mind a KB-V1, mind a MES-SA/Dx5 revertáns sejtvonalak esetében jelentős mértékű ABCB1 mRNS szint csökkenést mutattak ki (15. ábra, C és D panelek). Az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt KB-V1 sejtek esetében a transzporter mRNS expressziója 3 vegyületnél a kezeletlen multidrog rezisztens KB-V1 sejt expressziójának 3%-a alá, 1 esetben 18%-ra csökkent. A Western blot analízis során legmagasabb reziduális ABCB1 fehérje mennyiséget mutató revertáns vonal (NSC73306 kezelés) mRNS expressziója maradt a legmagasabb, 67%. Hasonlóképpen, a revertáns MES-SA/Dx5 sejtek esetében is az ABCB1 mRNS és fehérje szintek korrelációját tapasztaltuk. Tehát a kezelt sejtvonalak mindegyikében jelentős mértékű volt az ABCB1 mRNS szint csökkenés.

A sejtek MDR-szelektív vegyületekkel való kezelését megismételve hasonló eredményeket kaptunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a vegyületekkel való néhány hetes kezelés az ABCB1 mRNS és fehérje expressziójának csökkenésén keresztül okozza az multidrog rezisztens és párhuzamosan az MDR-szelektív fenotípus megszűnését.

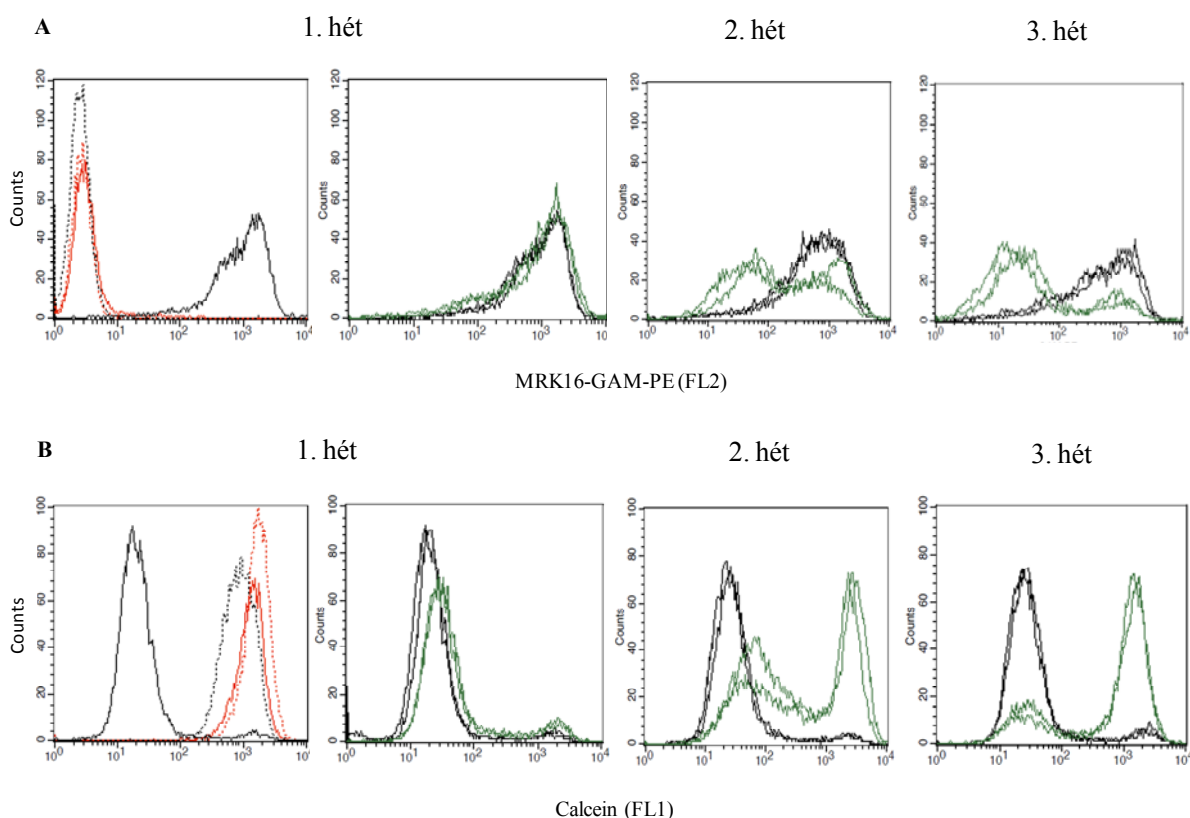
Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az ABCB1 fehérje expresszió jelentős csökkenése átmeneti, vagy stabil fenotípusos változás. A kezelt sejteket drogmentes médiumban további 4 hétig tenyésztve sem tapasztaltuk a transzporter fehérje expressziójának növekedését. A revertáns KB-V1 és MES-SA/Dx5 sejtvonalak doxorubicin érzékenysége stabilnak bizonyult.

#### **4.3.3 Az MDR-szelektív vegyületek ABCB1 fehérje expressziót és funkciót csökkentő hatásának vizsgálata áramlási citometriával**

Az MDR-szelektív vegyületekkel való kezelés hatására bekövetkező ABCB1 expresszió csökkenés mögött számos mechanizmus állhat. A jelenséget előidézheti a vegyületek ABCB1 fehérje mennyiségtől függő szelektív toxikus hatása, amely a szelekciós folyamat során a sejtpopulációban kis számban eleve jelenlévő alacsony ABCB1 expresszióval rendelkező sejteket részesíti proliferációs előnyben, ami populáció átlagos transzporter mennyiségének csökkenéséhez vezethet. Szintén lehetséges, hogy a vegyületek közvetlen hatással vannak az ABCB1 transzkripció szabályozására, mRNS stabilitására, ill. a génlókus epigenetikai módosulását is okozhatják. Mivel a gyors, néhány órán, esetleg napon belül lezajló expresszió változás a vegyületek közvetlen szabályozó hatását valószínűsítene, megvizsgáltuk a KB-V1 és MES-SA/Dx5 sejtek transzporter expresszióját a kezelés első 5 napjában. Sem fehérje, sem mRNS szinten nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést (adatok nincsenek bemutatva).

A továbbiakban MRK16 antitestessel jelöléssel hetenként követtük az MDR-szelektív vegyületekkel kezelt MES-SA/Dx5 sejtek ABCB1 kifejeződését. A FACS analízis lehetővé tette a sejtpopuláció-szintű változások követését a kezelés alatt. Vizsgálataink a kezelés 7. napján a sejtek homogén és magas ABCB1 expresszióját mutatták (16. ábra, A panel). A 2. hét végén a magas expressziójú populáció mellett megjelent egy sejtpopuláció az alacsonyabb fluoreszcencia intenzitású tartományban is. A 3. hét végére a gyengébb ABCB1 expresszióval rendelkező sejtek arányának nagy mértékű növekedését tapasztaltuk, és mindössze a sejtek néhány százaléka mutatott továbbra is magas transzporter kifejeződést. Az alacsony expressziót reprezentáló, de az izotípus kontroll fluoreszcencia intenzitásánál magasabb jelet adó sejtpopuláció a párhuzamosan végzett calcein akkumulációs esszé alapján nem mutatott efflux funkciót (16. ábra, B panel).

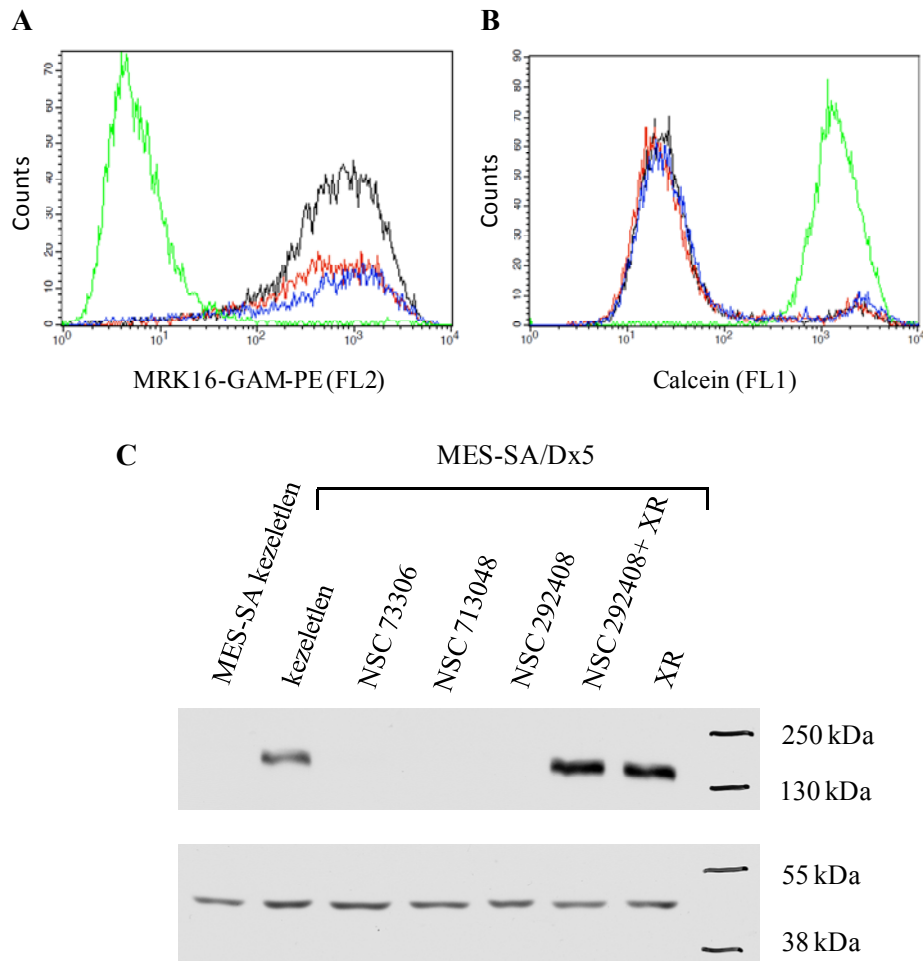




**16. ábra: NSC713048 által kiváltott ABCB1 expresszió csökkenés dinamikájának követése áramlási citometriával MES-SA/Dx5 sejteken.** A MES-SA/Dx5 sejteket 3 hétig kezeltük az NSC713048 IC<sub>25</sub> koncentrációjával. A) A sejtek MRK16 antitesttel jelölés (FACS) mért sejtfelszíni ABCB1 expressziójának változása a 3 hetes kezelés alatt. B) A sejtek calcein akkumulációs esszével mért ABCB1 efflux funkciójának (FACS) változása a 3 hetes kezelés alatt. Balról jobbra az első és második hisztogram a kezelés 7. napján, a harmadik hisztogram a kezelés 14. napján, a negyedik hisztogram a kezelés 21. napján mért eredményeket mutatja. A bal első hisztogramokon külön ábrázoltuk a MES-SA és MES-SA/Dx5 sejtek ABCB1 expresszióját (A panel) ill. calcein akkumulációját (B panel) az első hét végén. A színek a következők: (vörös) MES-SA sejtek, (fekete) MES-SA/Dx5 kezeltlen sejtek, (sötétzöld) NSC713048 vegyülettel kezelt sejtek. A kezeltlen (hatóanyaggal nem kezelt) sejteket csak a felhasznált vegyület oldószerének, a dimetil-szulfoxidnak (DMSO) azonos koncentrációjával kezeltük. A kezeléseket két-két párhuzamossal végeztük, ezért a második, harmadik, negyedik hisztogramokon 4-4 görbét láthatunk. Az izotípus kontroll antitesttel való jelölést (A panel) ill. a 10  $\mu$ M verapamil jelenlétében mért calcein akkumulációt (B panel) pontozott vonallal jelöltük.

#### 4.3.4 Az ABCB1 inhibitor XR9576 hatása az MDR-szelektív vegyületek által kiváltott transzporter expresszió csökkenésre

Mivel az MDR-szelektív vegyületek fokozott toxikus aktivitása az ABCB1 specifikus inhibitorának jelenlétében megszűnik, megvizsgáltuk, hogy a tariquidar (XR9576) jelenléte hogyan befolyásolja a MES-SA/Dx5 sejtek ABCB1 expressziójának csökkenését 3 hetes NSC292408 kezelés során.



**17. ábra:** Az ABCB1 inhibitor XR9576 hatása az NSC292408 ABCB1 expressziót csökkentő hatására MES-SA/Dx5 sejteken. A MES-SA/Dx5 sejteket 3 hétig kezeltük az NSC292408 IC<sub>25</sub> koncentrációjával 1  $\mu$ M XR9576 jelenlétében ill. anélkül. A) A sejtek MRK16 antitesttel jelöléssel (FACS) mért sejtfelszíni ABCB1 expressziója a kezelés 3. hetének végén. Az izotípus kontroll antitesttel való jelölés megerősítette az ABCB1 specifikus MRK16 kötődést (nincs bemutatva). B) A sejtek calcein akkumulációs esszével mért ABCB1 efflux funkciója (FACS) a 3 hetes kezelés vége után 2 héttel. A kontrollként alkalmazott 10  $\mu$ M verapamil gátolta az ABCB1 calcein-AM efflux funkcióját (nincs bemutatva). A színek a következők: (zöld) NSC292408 kezelt, (kék) NSC292408+XR9576 kezelt, (vörös) XR9576 kezelt, (fekete) kezeletlen sejtek. A kezeletlen (hatóanyaggal nem kezelt) sejteket csak a felhasznált vegyületek oldószerének, a dimetilszulfoxidnak (DMSO) azonos koncentrációjával kezeltük. C) A sejtek ABCB1 összfehérje mennyisége teljes sejtes lizátumból a kezelés 3. hetének végén (Western blot). A humán ABCB1 fehérje 170kDa, a kontroll  $\beta$ -aktin 42kDa.

Míg az NSC292408-al kezelt sejtek ABCB1 összfehérje mennyisége a 3. kezelési hét után készült Western blot alapján gyakorlatilag a detektálási küszöb alá csökkent, addig a tariquidar jelenlétében a vegyület nem okozott expresszió csökkenést (17. ábra, C panel). Az MRK16 antitesttel történő FACS analízis szintén a kezeletlen MES-SA/Dx5 sejtekhez hasonlóan magas és homogén sejtfelszíni expressziót mutatott ki a tariquidar és az

NSC292408 együttes alkalmazásának esetében, míg az MDR-szelektív vegyület önmagában alacsony szintre csökkentette a sejtfelszíni expressziót (17. ábra, A panel). A calcein esszét két héttel a drogkezelés befejezése után tudtuk csak elvégezni, mivel a 3 hetes kezelés alatt a sejtekben felhalmozódott tariquidar gátolja az ABCB1 calcein-AM efflux funkcióját. A mérés azt mutatta, hogy az alacsony szintű sejtfelszíni ABCB1 expresszió az NSC292408-al kezelt sejteken nem képes a calcein akkumuláció csökkentésére (17. ábra, B panel). Ezenkívül, az inhibitorral és az NSC292408-al közösen kezelt sejtek calcein akkumulációja a kezeltlen MES-SA/Dx5 sejtekéhez hasonlóan alacsony volt.

A tariquidar önmagában való alkalmazása sem a sejtfelszíni ABCB1 expressziót, sem a sejtek calcein felvételét nem befolyásolta, ezzel szemben a Western blot analízis alapján az ABCB1 összfehérje mennyisége megnövekedett az inhibitor jelenlétében.

Eredményeink arra utalnak, hogy az MDR-szelektív vegyületek ABCB1 expressziót csökkentő hatása függ a transzporter működésétől. Az expressziócsökkenés viszonylag lassú üteme, továbbá a tariquidar jelenlétében a csökkenés elmaradása azt valószínűsíti, hogy a jelenség mechanizmusában a szelekciós folyamat alapvető szerepet játszik.

## 5 EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A rákgyógyítás mai megközelítése a tumorsejtek célzott pusztítása, melynek hatékonysága a tumornövekedés ill. a tumorsejtek egyedi sajátosságainak, molekuláris rezisztencia mechanizmusainak megismerésén és kihasználásán alapul. Az egyik legtöbbet tanulmányozott rezisztencia mechanizmus az ABCB1 transzporter efflux funkciója, melynek szerepét nemcsak a hagyományos, hanem a célzott terápiás hatóanyagokkal szemben kialakuló védettségben is leírták [79, 167]. A klinikai kísérletek, melyekben a citosztatikumokkal való kezelést *in vitro* eredmények alapján igen hatékony ABCB1 inhibitorokkal egészítették ki, eddig nem igazolták a transzporterfunkció-gátlás megközelítésének terápiás hatékonyságát [11].

Az 1950-es években először megfigyelt érdekes jelenség [105], a rezisztens sejtek fokozott érzékenysége bizonyos toxikumokkal szemben, ma már az antimikrobiális és rákellenes sejtes rezisztenciát kísérő általános jelenséggént írható le, a számos, elszórt megfigyelésen alapuló irodalmi adat ismeretében. A túlérzékenységet okozhatja a rezisztenciát biztosító molekuláris mechanizmus maga, vagy egyéb, a rezisztencia kialakulása során a sejtekben megjelenő molekuláris változás is, mely a védettség mechanizmusától független.

Elképzelésünk az volt, hogy az ABCB1 transzporter funkciója által kiváltott multidrog rezisztencia a fehérje funkciójának gátlása helyett annak kihasználásával is támadható lehet, az ABCB1 működése által okozott drog-indukált túlérzékenységen (MDR-szelektív citotoxicitás) keresztül. Azt feltételezve, hogy a DTP NCI-60 sejtpaneljének ABCB1 mRNS expressziója és drogérzékenysége között adódó pozitív korreláció tükrözheti az ABCB1 funkció és a túlérzékenység mértéke közötti ok-okozati kapcsolatot, 43 000 vegyület között kerestünk MDR-szelektív vegyületeket. Szisztematikus megközelítésünknek természetesen több gyenge pontja van. Az NCI-60 panelen mért citotoxicitási profilok nagy része egyetlen citotoxicitási mérésből származik, ami a primer adatok minőségében variabilitást okozhat. Ezenkívül elképzelhető, hogy a vegyületek nem tiszta formában kerültek felhasználásra, ill. az is valószínűsíthető, hogy a sejtvonalak eltérő drogmetabolizmusa, rezisztencia mechanizmusai befolyásolják a sejtek drogérzékenységét. Megközelítésünk alkalmasságát bizonyítja, hogy ezen körülmények mellett is összesen 36 új MDR-szelektív vegyületet azonosítottunk, melyek az ABCB1 transzporter jelenlétében fokozottabb toxikus aktivitást mutatnak. A szelektív toxicitás mértéke változó volt, míg néhány vegyület kismértékű, bár statisztikailag szignifikáns

MDR-szelektív aktivitást mutatott, mások, mint például az NSC693871, számottevően nagyobb mértékű szelektív érzékenységet váltottak ki.

A nagyszámú MDR-szelektív vegyület azonosításának jelentőségét növeli, hogy igen kevés olyan vegyület ismert, melyek érzékenyítő hatása bizonyítottan az ABCB1 működésétől függ, azaz közvetlen módon kapcsolható a kemoterapeutikumokkal szemben mutatott multidrog rezisztenciához. Az ABCB1 szubsztrát verapamil esetében a túlérzékenység mechanizmusa a transzporter verapamil által stimulált ATP-áz aktivitása, és a sejtek ennek következtében fokozódó energiatermelése, mely nagyobb mennyiségű reaktív oxigén gyök képzésén keresztül pusztítja a sejteket [130]. A Triton X-100 és a Nonidet P-40, melyek szelektív aktivitása a feltételezések szerint a plazmamembrán tulajdonságait befolyásoló hatásukhoz köthető, szintén ABCB1 szubsztrátok [111, 133]. A három felsorolt vegyületen kívül egyedül az NSC73306 érzékenyítő hatásának transzporterfunkció-függése bizonyított, melyet korábban szintén kutatócsoportunk azonosított [131, 141]. Az MDR sejtek kollaterális érzékenységének oka nagyon sok esetben a rezisztens fenotípust kialakító szelekciós folyamatnak melléktermékeként kialakuló molekuláris változás, mely az adott sejtvonalat érzékenyíti, míg egy másikat a sejtspecifikus jellemzők hiányában nem [120, 135]. Ezért több, köztük egy izogenikus, transzfekcióval létrehozott ABCB1-et kifejező MDR sejtvonalon is igazoltuk, hogy vegyületeink szelektív aktivitását nem a KB-V-1 sejtvonal egyedi tulajdonságai okozzák. Érdekes módon egy, a közelmúltban leírt MDR sejtvonalakon túlérzékenységet kiváltó vegyület, a tiopronin toxicitása annak ellenére függetlennek bizonyult az ABCB1 transzporter működésétől, hogy a szerzők izogenikus, egyedül a fehérje overexpressziójában különböző sejtvonalpáron is megfigyelték a vegyület érzékenyítő hatását [168]. Hasonlóképpen, több flavonoid típusú desmosdumotin B analóg esetében megfigyelhető, hogy a sokszor rendkívül nagymértékű (akár 200-szoros), az ABCB1 jelenlétéhez kapcsolódó túlérzékenység az ABCB1 inhibitor jelenlétében nem szűnik meg [169]. Vegyületeink szelektív aktivitásának ezzel szemben a transzporter működése szükséges és elégséges feltétele. Ezt az ABCB1 specifikus inhibitorának, és a transzporter ATP-áz deficiens, funkcióképtelen mutánsának felhasználásával is igazoltuk. Továbbá megvizsgáltuk azt is, hogy vegyületeink szelektív érzékenyítő hatása általánosan köthető-e az ABC fehérjecsaládba tartozó multidrog transzporterek aktivitásához, vagy specifikus az ABCB1 működésére. Érdekes módon, egy általunk is azonosított, de validálásra nem elérhető vegyület, a KP772 1,10-fenantrolin-lantán komplex ABCB1 funkciófüggő

toxicitását leíró munkacsoport ABCG2 transzporter jelenlétében is hasonló érzékenyítő hatást írt le [166]. Eredményeink szerint az MDR-szelektív vegyületek (köztük az NSC292408 1,10-fenantrolin származék) az ABCG2 transzportert overexpresszáló sejteken nem váltanak ki fokozott toxicitást, hatásuk ABCB1-specifikus.

Az analízisünk során validálásra eddig nem elérhető 29 vegyület vizsgálatát ill. a validált MDR-szelektív molekulák inhibitor jelenlétében mutatott toxicitásvizsgálatát a továbbiakban a rendelkezésre álló drogmennyiségektől függően természetesen folytatni szeretnénk.

A nagyszámú MDR-szelektív vegyület kémiai szerkezeti hasonlóságának elemzése több gyakrabban előforduló struktúrális alapotívum azonosítását tette lehetővé, melyek alapján hasonlósági kereséssel további MDR-szelektív vegyületeket validálhattunk. A szelektív toxicitás és a szerkezet szoros összefüggését legmegbízhatóbban a leggazdagabban reprezentált tioszemikarbazon csoport mutatja, melynek 13 validált molekulája közül 6 vegyületet szerkezeti hasonlóság alapján azonosítottunk. A csoportban találjuk az NSC73306-ot is, mely a DTP-ből elsőként azonosított MDR-szelektív ágens. Hall és kollégáinak izatin- $\beta$ -tioszemikarbazonokra fókuszáló munkája több további analóg MDR-szelektív toxicitását validálta a KB-3-1/KB-V1 sejtvonalpáron [170]. A közelmúltban leírt tioszemikarbazon Dp44mT, melynek hatékony rákellenes aktivitását számos tumorsejtvonalon igazolták, szintén fokozott citotoxicitást mutatott ABCB1 transzportert overexpresszáló MDR sejteken, ami megerősíti a tioszemikarbazon motívum és az ABCB1-függő szelektív aktivitás összefüggését [171]. Vegyületeink között a tioszemikarbazonokon kívül a szintén fémion-keláló tulajdonságú fenantrolin és bipiridin analógok, ill. a fémkomplexek feldúsulását is tapasztaltuk. Míg a tioszemikarbazonok 14%-át adják korrelációs analízisünk találatainak, a DTP összes molekulájának csupán 1%-át, ami 12-szeres feldúsulást jelent. Mindösszesen csupán 25 fenantrolin és 56 bipiridin vegyület található az eredeti készletben (ez 0,09 és 0,12%-ot jelent), ami alapján vegyületeink között a fenantrolinok 1500-szoros, a bipiridinek 750-szeres feldúsulást mutatnak. Hasonlóképpen, a 8 fémtartalmú komplex 12,5%-át képző molekulajelöltjeinknek, míg a DTP adatbázisban található molekuláknak csupán 2,7%-a alkot komplexeket, ideértve a nátrium- és kalciumion tartalmú komplexeket is. A vegyületeink között ezenkívül több, szintén fémkeláló tulajdonságú 8-hidroxi-kinolin származék is található.

Az NCI-60 tumorsejtpanel drogérzékenységi profilja már számos esetben alkalmasnak bizonyult ismeretlen hatásmechanizmusú vegyületek célmolekuláinak azonosítására, a vegyület toxicitási-profiljának és már ismert mechanizmusú toxikumok aktivitásának összevetése alapján [144]. A „Self Organizing Map” (SOM) (önszervező térkép) [172] alapú klaszterezési algoritmus a vegyületek hatásmechanizmusát prediktálja az NCI-60 panelen mért drogaktivitási mintázatuk elemzése alapján, elhelyezve az elemzett vegyületet egy vizuálisan könnyen értelmezhető funkció-térképen, melyet már ismert hatásmechanizmusú vegyületek drogaktivitási profilja szervez [173].

Annak vizsgálatára, hogy az általunk azonosított 22 MDR-szelektív vegyület közös hatásmechanizmussal rendelkezik-e, megvizsgáltuk, hogy vegyületeink SOM alapú klaszterezéssel milyen hatásmechanizmus-régióba ill. al régióba lokalizálódnak az NCI-60 drogérzékenységi adatai alapján [144].

Molekuláink több, mint fele (6-12 klaszterek, összesen 12 vegyület) az „S” régióba klasztereződött, ahol számos fémkomplex és kelátor ligandum is található (1,10-fenantrolin és 2,2'-bipiridin fémkomplexek, tioszemikarbazonok) [163]. A régiót szervező ismert hatásmechanizmusú vegyületek aktivitása összességében a nukleinsav metabolizmushoz köthető [173]. A tioszemikarbazon NSC73306-ot és a 8-hidroxi-kinolinokat (NSC693871, NSC793872) is tartalmazó nagyobb 8-as klaszter felveti a közös hatásmechanizmus lehetőségét. A 6, 7, 10 klasztereket alkotó MDR-szelektív vegyületek, továbbá az 1,10-fenantrolin és ennek ón komplexe, az NSC292408 szintén a 8-as számú klaszter közelében helyezkednek el.

Eredményeink azt jelzik, hogy az MDR-szelektív kelátorok a biológiailag fontos fémionok számos típusával képesek komplexeket létrehozni, ideértve a vasat is. A vas és réz kelátorok hatékony rákellenes ágensekként használhatóak [174], ill. számos klinikumban használt molekula, mint például a bleomycin, a triapin és a hidroxiurea mutatja, hogy a fémekkel való interakción alapuló hatásmechanizmus a kemoterápiában felhasználható lehet [175].

Az itt felsorolt eredményekre alapozva azt gondoljuk, hogy a fémionokkal történő interakció kulcsfontosságú lehet legalábbis az MDR-szelektív vegyületek egy alcsoportjában. A keláló vegyületek ill. fémkomplexek számos molekuláris mechanizmussal válhatnak ki toxikus hatást az osztódó tumorsejtekben. A proliferáló sejtek magas vas igénye miatt [176] a keláló ligandumok által okozott vasdepláció, vagy a DNS szintézishez nélkülözhetetlen, deoxinukleotid szintézisben kiemelt szerepet játszó,

vastartalmú ribonukleotid reduktáz enzim gátlása is a sejtek pusztulásához vezethet [174]. Ezenkívül a fém-ligandum komplexeken lejátszódó redox-ciklusok reaktív oxigén gyökök képzésén keresztül is kiválthatnak toxikus hatást. Az NSC73306 és 1,10-fenantrolin ligandumokkal, ill. ezen vegyületek fémkomplexeivel végzett citotoxicitási vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a szelektív aktivitás kiváltásáért a ligandum, és nem a fémion, vagy a fém-ligandum komplex felelős, ugyanis a ligandumok és a komplexek által kiváltott szelektivitás hasonló mértékű. Feltételezhető, hogy a komplexek szerepe csupán a ligandum bejuttatása a sejtekbe. Lehetségesnek tartjuk, hogy az ABCB1 transzporter aktivitása valamilyen módon megnövelheti a sejtek érzékenységét ezekkel a folyamatokkal szemben. Ugyanakkor a keláló ágens deferrioxamin (DFO), ill. a nem szubsztituált 8-hidroxi-kinolin szelektív toxicitásának hiánya alapján azt gondoljuk, hogy a fémkeláló képesség önmagában nem elegendő a szelektív aktivitás kiváltásához.

Felmerül a kérdés, hogy MDR-szelektív vegyületeink és az ABCB1 transzporter között létrejövő specifikus kölcsönhatás szükséges-e a szelektív toxicitás kiváltásához. A munkánkat megelőzően már ismert, az irodalmi bevezetésben részletesen bemutatott ABCB1 funkciófüggő toxicitást kiváltó verapamil, Triton X-100, Nonidet P-40 vegyületek mindegyike az ABCB1 transzporter szubsztrátjának bizonyult. Ezzel szemben a tioszemikarbazon NSC73306-ról ismert, hogy nem lép közvetlen kölcsönhatásba a transzporterrel [125]. Azonosított vegyületeink transzporterrel való interakciójának előzetes vizsgálatai is azt a hipotézist támogatják, hogy a vegyületek célpontja nem az ABCB1 transzporter maga.

Eredményeinket ezen a ponton úgy összegezhetjük, hogy az azonosított 36 új MDR-szelektív vegyület a reprezentált szerkezeti sokféleség alapján akár több különböző hatásmechanizmus révén is érzékenyítheti az ABCB1 transzportert kifejező sejteket, azonban a fémionkelálás szerepe több kémiai szerkezetét tekintve koherens alcsoport esetében is fontos eleme lehet a hatásmechanizmusnak, melynek azonban a transzporterrel való közvetlen interakció nem alapfeltétele.

Az ABCB1 transzporter működésének érzékenységet kiváltó mechanizmusa egyelőre ismeretlen. Számos irodalmi adat támasztja alá a transzportert overexpresszáló sejtek megnövekedett energiaigényét [177] [137], melyet az ABCB1 transzporter magas ATP-t hidrolizáló alapaktivitása, vagy endogén szubsztrátok által stimulált hidrolitikus működése eredményezhet [178]. Az energiatermelés megnövekedett sebességét vagy a



mitokondriumban zajló terminális oxidáció aktivitásának fokozódásával [136], vagy a laktát termeléssel járó ún. aerob glikolízis indukálódásával magyarázzák a szerzők [137, 138, 177]. Érdekes itt megemlíteni, hogy az intracellulárisan fellépő vashiány a HIF-1 alfa transzkripciós faktor indukcióját okozza, utóbbi pedig a sejtek energiaanyagcseréjét a laktát termelő glikolízis irányába tolhatja el [179].

Az MRP1 multidrog transzporter működése által okozott túlérzékenység oka a transzporter efflux funkciója. A sejtekben felhalmozódó reaktív oxigén gyökök káros hatását csökkentő glutation a transzporter szubsztrátja, ill. szubsztrátjainak gyakran konjugált része. Ezért a glutation szintézisét gátló butionin-szulfoximin (BSO) kezeléssel az MRP1-et kifejező sejtek érzékenyíthetők [125]. Elképzelhető, hogy az ABCB1 szintén valamely endogén szubsztrát kipumpálása révén érzékenyíti a sejteket az MDR-szelektív ágensek toxikus hatására. Kutatócsoportunk jelenleg is számos kísérletet végez a szelektív toxicitás mechanizmusának felderítésére.

Az NSC73306-ról Ludwig és kollégái már korábban leírták, hogy a vegyülettel való 3 hetes kezelés jelentősen csökkenti az MDR sejtek ABCB1 fehérje kifejeződését [131]. Kísérleteinkkel először igazoltuk, hogy az MDR-szelektív vegyületeknek ABCB1 mRNS expressziót csökkentő hatása van a szelekcióval létrehozott multidrog rezisztens tumorsejtvonalakon. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy a transzporterfunkció gátlásával megakadályozható expressziócsökkenésben az MDR-szelektív vegyületek proliferációt gátló hatásának alapvető szerepe van. Mivel azonban a vegyületek nemcsak alacsony toxicitású ( $IC_{25}$ ), hanem szubtoxikus koncentrációban is kiváltották az ABCB1 expresszió drasztikus csökkenését, egyelőre nem kizárható az sem, hogy a csökkenés hátterében közvetlenül a transzkripciót, vagy az mRNS stabilitását befolyásoló folyamat is szerepet játszik.

A szelekcióval létrehozott multidrog rezisztens sejtvonalak igen magas ABCB1 expressziója sok esetben a transzporter génjének amplifikációjával magyarázható [180, 181]. Mivel a MES-SA/Dx5 sejtek esetében ismert, hogy a génamplifikációval keletkezett plusz génkópiák a genomba integrálva találhatók, melyek a sejtvonal tenyésztése során stabil mRNS overexpressziót biztosítanak, megvizsgáltuk a sejtvonalban az MDR1 kópiaszám változását a 3 hetes kezelés után. Stabil kópiaszámot mutató eredményeink alapján ez a sejtvonal a továbbiakban alkalmas lehet az mRNS szint csökkenés mechanizmusának részletes vizsgálatára. Az ABCB1 kifejeződés szabályozásában az MDR1 gén 5' régióját érintő DNS-metilációnak és

hisztionacetilációnak is alapvető szerepe van [182], többek között a MES-SA/Dx5 sejtvonal esetében is [181], ezért a sejtvonal megfelelő modell az ABCB1 expressziót befolyásoló epigenetikai folyamatok követésére is. Azon kívül tehát, hogy az MDR-szelektív vegyületek krónikus hatása terápiás jelentőséggel bírhat, mivel újraérzékenyíti az MDR sejteket az ABCB1 szubsztrát kemoterapeutikumokkal szemben, az MDR fenotípusukat elvesztő drogérzékeny sejtek hasznos modellként szolgálhatnak az ABCB1 regulációjának vizsgálatához, melyet kutatócsoportunk jelenleg is végez.

Az összesen 36 új MDR-szelektív vegyület szisztematikus analízissel történő azonosítása igazolta, hogy az ABCB1 transzporter működése valóban érzékenyítheti a sejteket a drogindukált toxikus hatásokkal szemben. Az itt bemutatott eredmények jelzik, hogy az MDR-szelektív vegyületek alkalmasak lehetnek az MDR sejtek célzott pusztítására, ill. ezen sejtek újraérzékenyítésére a kemoterápiában alkalmazott ABCB1 transzporter-szubsztrát citosztatikumokkal szemben, miközben számos aktív farmakofórt is biztosítanak. Az általunk azonosított vegyületek további elemzése eldönti majd, hogy az itt bemutatott ABCB1 expressziót kísérő MDR-szelektív fenotípus alapját képezheti-e egy, a multidrog rezisztencia problémáját megoldó hatékony és új terápiás megközelítésnek.

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

Az ABCB1 transzporter efflux funkciója által okozott kemoterápiás multidrog rezisztencia (MDR) problémájának megoldására doktori munkám során olyan vegyületeket azonosítottam és vizsgáltam, melyek a transzporter funkciójának gátlása helyett, a funkció kihasználása révén képesek a multidrog rezisztens (MDR) tumorsejtek célzott pusztítására. Munkám kiindulópontja az a megfigyelés volt, hogy az MDR sejtek túlérzékenységet mutatnak az ún. MDR-szelektív vegyületek toxikus hatásával szemben.

Az ABCB1-függő túlérzékenységet okozó vegyületeket szisztematikusan megközelítéssel kerestem a DTP vegyülettárában, az NCI-60 tumorsejtpanel drogérzékenységi és ABCB1 expressziós mintázatát korreláltatva. Az analízis alapján összesen 22 vegyület ABCB1 transzporter jelenlétében mutatott fokozott toxicitását igazoltam.

Funkcióképtelen, "Walker A" mutációt hordozó transzporter variánszon végzett vizsgálatokkal mutattam meg, hogy az "MDR-szelektív toxicitás" a transzporter funkciójától függ, és független a sejtek szöveti háttérétől. Továbbá a funkcionáló ABCG2 multidrog transzporter jelenléte a sejteken nem fokozta a vegyületek toxikus hatását.

Az MDR-szelektív vegyületek kémiai szerkezetüket tekintve koherens alcsoportjainak alapotívumai és a szelektív aktivitás szoros összefüggését igazoltam 15 további vegyület kémiai hasonlóság alapján történő azonosításával. A fémionokat keláló struktúrális alapotívumok és fémkomplexek gyakorisága felveti a fémion-kötés szerepét a szelektív aktivitás mechanizmusában.

Az MDR-szelektív vegyületekkel való hosszútávú kezelés a humán MDR sejtvonalak ABCB1 fehérje és mRNS expressziójának jelentős mértékű csökkenését eredményezte, és egyben az MDR fenotípus elvesztéséhez vezetett.

A szisztematikusan analízissel azonosított 36 új MDR-szelektív vegyület igazolja az ABCB1 transzporter funkciójának drogérzékenységet növelő hatását, ami lehetővé teszi az MDR sejtek célzott pusztítását ill. újraérzékenyítését a kemoterápiában alkalmazott ABCB1 transzporter-szubsztrát citosztatikumokkal szemben.

## 7 SUMMARY

In an effort to overcome multidrug resistance caused by the efflux function of the ABCB1 transporter I identified and characterized compounds that exploit rather than inhibit transporter function to selectively kill MDR cancer cells. The basis of my PhD work was the initial observation that MDR cells show hypersensitivity against the toxic effects of so-called MDR-selective compounds.

In search for agents exploiting ABCB1-dependent hypersensitivity I applied a systematic screening method based on the correlation analysis of the drug sensitivity and ABCB1 expression patterns of the NCI-60 cell panel. The analysis resulted in the validation of 22 MDR-selective compounds that show elevated toxicity in the presence of functional ABCB1.

Based on experiments conducted with cell lines engineered to overexpress a non-functional ABCB1 variant harboring mutations at the critical Walker A lysine residues I showed that the „MDR selective phenotype” depends on the transporter activity and is independent of the cellular background. Furthermore, functional presence of the multidrug transporter ABCG2 did not result in the enhanced toxicity of the compounds.

Analysis of the structural coherence of the MDR-selective molecules defined several subgroups with distinct chemical motifs. Based on similarity search 15 further compounds were identified proving strong relationship between the chemical structures and selective activity. The prevalence of well known metal chelating structures and metal complexes among the compounds suggests the role of metal binding in the mechanism of selective toxicity.

Long term treatment of human MDR tumor cell lines with MDR-selective compounds resulted in a significant decrease in ABCB1 protein and mRNA expression levels, and ultimately in the loss of the MDR phenotype.

The systematic approach that identified 36 new MDR-selective compounds demonstrates that the function of ABCB1 is able to sensitize MDR cancer cells to drug induced cytotoxicity. The identified phenomenon is suitable for the selective targeting of MDR cancer cells and for the resensitization of these cells against the toxic effects of ABCB1 substrate chemotherapeutic agents.

## 8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szakács Gergelynek, hogy olyan kutatási témán dolgozhattam, ami több éves munka után is folyamatosan inspirál és tanulásra ösztönöz. Köszönöm, hogy tudományos gondolkodásra tanított és nemcsak szakmai, hanem baráti tanácsaival is támogatott.

Szeretném megköszönni Dr. Sarkadi Balázsnak és Dr. Váradi Andrásnak, hogy az általuk vezetett magas színvonalú kutatóközösség tagja lehettem, és rendszeresen részt vehettem a munkabeszámolók szakmai vitáiban, ahol rengeteg gyakorlati és elméleti tudást kaptam kollégáimtól.

Köszönöm Kucsma Nórának, hogy kísérleteivel hozzájárult eredményeimhez és Dr. Várady Györgynek, hogy segítséget nyújtott a sejtvonalak létrehozásában. Mindketten számos alkalommal támogattak szakmai és gyakorlati tanácsaikkal.

Köszönet illeti Dr. Orbán Tamást a rendelkezésemre bocsátott vektor konstrukciókért, és Dr. Német Katalint, akitől vizsgálataimhoz sejtvonalakat kaptam.

Szeretném megköszönni szerzőtársam, Dr. Matthew D. Hall munkáját, aki fontos eredményekkel járult hozzá doktori munkám eredményeihez, és köszönet illeti Michael M. Gottesman-t, aki témavezetőmmel együtt a kutatói együttműködést vezette.

Köszönöm Veronika Pape-nek a közös kutatási témában való együttműködést, és kutatócsoportom minden tagjának, hogy munkámban kedvességükkel és tanácsaikkal nap mint nap segítettek.

Szintén hálás vagyok kollégáimnak és szobatársaimnak, Kolacsek Orsolyának, Schamberger Anitának, Sándor Sárának és Nagy Zsuzsannának, hogy barátságukkal és optimista jelenlétükkel olyan légkört teremtettek, amiben örömmel dolgozhattam.

Köszönöm Bátкаи Mónikának, aki a pipettort és a sejtes flaskát először a kezembe adta, hogy miközben a steril munkára tanított, barátságával első lépéseimtől mellettem állt.

A sorok végén említem, de mindenek felettinek érzem és a legnagyobb hálával köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy minden erejükkel és teljes szívükkel támogattak ebben a nehéz küzdelemben is. Páromnak, Dr. Kovács Krisztiánnak külön köszönettel tartozom nemcsak hasznos szakmai tanácsaiért, hanem türelmes szeretetéért is, amivel mindvégig mellettem állt.

## 9 KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### 9.1 Az értekezés témájában megjelent saját közlemények

1. **Dóra Türk**, Matthew D. Hall, Benjamin F. Chu, Joseph A. Ludwig, Henry M. Fales, Michael M. Gottesman, Gergely Szakács. (2009) Identification of compounds selectively killing multidrug resistant cancer cells, *Cancer Research* 69 (21), 8293-8301
2. **Dóra Türk**, Gergely Szakács. (2009) Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy, *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 12 (2), 246-252
3. Veronika F.S. Pape, **Dóra Türk**, Michael Wiese, Gergely Szakács, Eva A. Enyedy. Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinyldrazone derivatives. (a *Journal of Inorganic Biochemistry* folyóiratban revízió alatt)

### 9.2 Egyéb közlemények

1. Orsolya Bársony, Gábor Szalóki, **Dóra Türk**, Szabolcs Tarapcsák, Imre J. Holb, Lóránt Székvölgyi, Gábor Szabó, Gergely Szakács, Katalin Goda. P-gp seesaws between high and low drug-affinity conformations upon formation and dissociation of the NBD dimer. (kézirat előkészületben)

## 10 HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D & Bray F (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* **49**, 1374-1403, doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
2. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C & Negri E (2013) European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol* **24**, 792-800, doi: 10.1093/annonc/mdt010.
3. Riemann JF (2011) Colonoscopy screening: status in Europe. *Dig Dis* **29** Suppl 1, 53-55, doi: 10.1159/000331130.
4. Siegel R, Naishadham D & Jemal A (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **63**, 11-30, doi: 10.3322/caac.21166.
5. Longley DB & Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* **205**, 275-292, doi: 10.1002/path.1706.
6. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28.
7. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ & Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* **6**, 924-935, doi: 10.1038/nrc2013.
8. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, et al. (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114-1117, doi: 10.1038/nature09515.
9. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**, 883-892, doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
10. Greaves M & Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306-313, doi: 10.1038/nature10762.
11. Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, Fojo AT & Bates SE (2012) Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resist Updat* **15**, 50-61, doi: 10.1016/j.drug.2012.02.002.
12. Shaffer BC, Gillet JP, Patel C, Baer MR, Bates SE & Gottesman MM (2012) Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat* **15**, 62-69, doi: 10.1016/j.drug.2012.02.001.
13. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C & Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219-234, doi: 10.1038/nrd1984.

14. Lage H (2008) An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3145-3167, doi: 10.1007/s00018-008-8111-5.
15. Gonen N & Assaraf YG (2012) Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat* **15**, 183-210, doi: 10.1016/j.drug.2012.07.002.
16. Showalter SL, Showalter TN, Witkiewicz A, Havens R, Kennedy EP, Hucl T, Kern SE, Yeo CJ & Brody JR (2008) Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. Is it time to move forward? *Cancer Biol Ther* **7**, 986-994.
17. Chan JY & Ali-Osman F (1998) In vitro repair synthesis of BCNU-induced DNA damage. *Cancer Biochem Biophys* **16**, 273-286.
18. Iwasaki H, Huang P, Keating MJ & Plunkett W (1997) Differential incorporation of ara-C, gemcitabine, and fludarabine into replicating and repairing DNA in proliferating human leukemia cells. *Blood* **90**, 270-278.
19. Hartmann JT & Lipp HP (2006) Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* **29**, 209-230.
20. Chen JG & Horwitz SB (2002) Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer research* **62**, 1935-1938.
21. Rebucci M & Michiels C (2013) Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* **85**, 1219-1226, doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.017.
22. Langer SW (2014) Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects. *Cancer Manag Res* **6**, 357-363, doi: 10.2147/CMAR.S47238.
23. Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
24. Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
25. Hamada S, Masamune A & Shimosegawa T (2013) Novel therapeutic strategies targeting tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Front Physiol* **4**, 331, doi: 10.3389/fphys.2013.00331.
26. Adochite RC, Moshnikova A, Carlin SD, Guerrieri RA, Andreev OA, Lewis JS & Reshetnyak YK (2014) Targeting breast tumors with pH (low) insertion peptides. *Mol Pharm* **11**, 2896-2905, doi: 10.1021/mp5002526.
27. Afar DE, Goga A, Cohen L, Sawyers CL, McLaughlin J, Mohr RN & Witte ON (1994) Genetic approaches to defining signaling by the CML-associated tyrosine kinase BCR-ABL. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 589-594.
28. Landi L & Cappuzzo F (2013) HER2 and lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **13**, 1219-1228, doi: 10.1586/14737140.2013.846830.



29. Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Liebetanz J, Mestan J, O'Reilly T, Traxler P, Chaudhuri B, et al. (2002) Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* **93**, 79-98.
30. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, et al. (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3041-3046, doi: 10.1073/pnas.0711741105.
31. Huang Z, Wu Y, Zhou X, Xu J, Zhu W, Shu Y & Liu P (2014) Efficacy of therapy with bortezomib in solid tumors: a review based on 32 clinical trials. *Future Oncol* **10**, 1795-1807, doi: 10.2217/fon.14.30.
32. Cesca M, Bizzaro F, Zucchetti M & Giavazzi R (2013) Tumor delivery of chemotherapy combined with inhibitors of angiogenesis and vascular targeting agents. *Front Oncol* **3**, 259, doi: 10.3389/fonc.2013.00259.
33. Labianca R, La Verde N & Garassino MC (2007) Development and clinical indications of cetuximab. *Int J Biol Markers* **22**, S40-46.
34. Spector NL & Blackwell KL (2009) Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* **27**, 5838-5847, doi: 10.1200/JCO.2009.22.1507.
35. Teicher BA (2009) Antibody-drug conjugate targets. *Curr Cancer Drug Targets* **9**, 982-1004.
36. Sacha T (2014) Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **6**, e2014007, doi: 10.4084/MJHID.2014.007.
37. Powles T, Chowdhury S, Jones R, Mantle M, Nathan P, Bex A, Lim L & Hutson T (2011) Sunitinib and other targeted therapies for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **104**, 741-745, doi: 10.1038/sj.bjc.6606061.
38. Shinohara Y, Takahashi N, Nishiwaki K, Hino M, Kashimura M, Wakita H, Hatano Y, Hirasawa A, Nakagawa Y, Itoh K, et al. (2013) A multicenter clinical study evaluating the confirmed complete molecular response rate in imatinib-treated patients with chronic phase chronic myeloid leukemia by using the international scale of real-time quantitative polymerase chain reaction. *Haematologica* **98**, 1407-1413, doi: 10.3324/haematol.2013.085167.
39. Nooka AK, Kaufman JL, Behera M, Langston A, Waller EK, Flowers CR, Gleason C, Boise LH & Lonial S (2013) Bortezomib-containing induction regimens in transplant-eligible myeloma patients: a meta-analysis of phase 3 randomized clinical trials. *Cancer* **119**, 4119-4128, doi: 10.1002/cncr.28325.
40. Kim KH, Kim HY, Kim HR, Sun JM, Lim HY, Lee HJ, Lee S, Bae WK & Rha SY (2014) Efficacy and toxicity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma with renal insufficiency. *Eur J Cancer* **50**, 746-752, doi: 10.1016/j.ejca.2013.11.029.

41. Kuiper JL & Smit EF (2014) Challenges in the management of EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Oncology* **87**, 83-94, doi: 10.1159/000362819.
42. Jabbour EJ, Cortes JE & Kantarjian HM (2013) Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **13**, 515-529, doi: 10.1016/j.clml.2013.03.018.
43. Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N & Ishikawa T (2007) The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 71-83, doi: 10.1007/s10555-007-9045-3.
44. Someya H, Shaddix SC, Tiwari KN, Secrist JA, 3rd & Parker WB (2003) Phosphorylation of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylecytosine and its analogs by human deoxycytidine kinase. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 1314-1322, doi: 10.1124/jpet.102.045435.
45. Dumontet C, Bauchu EC, Fabianowska K, Lepoivre M, Wyczechowska D, Bodin F & Rolland MO (1999) Common resistance mechanisms to nucleoside analogues in variants of the human erythroleukemic line K562. *Adv Exp Med Biol* **457**, 571-577.
46. Kelland LR (1993) New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* **15**, 191-219.
47. Li LH, Dong H, Zhao F, Tang J, Chen X, Ding J, Men HT, Luo WX, Du Y, Ge J, et al. (2013) The upregulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in liver is involved in acquired resistance to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* **49**, 1752-1760, doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.013.
48. Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P & Grant S (2004) A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *The Journal of biological chemistry* **279**, 34227-34239, doi: 10.1074/jbc.M402290200.
49. Ganguly A, Yang H & Cabral F (2011) Overexpression of mitotic centromere-associated Kinesin stimulates microtubule detachment and confers resistance to paclitaxel. *Mol Cancer Ther* **10**, 929-937, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1109.
50. Danks MK, Schmidt CA, Cirtain MC, Suttle DP & Beck WT (1988) Altered catalytic activity of and DNA cleavage by DNA topoisomerase II from human leukemic cells selected for resistance to VM-26. *Biochemistry* **27**, 8861-8869.
51. Xie SM, Fang M, Guo H & Zhong XY (2011) Silencing of MGMT with small interference RNA reversed resistance in human BCUN-resistant glioma cell lines. *Chin Med J (Engl)* **124**, 2605-2610.
52. Chen X, Jia J, Ma H, Wang S & Wang X (2009) Characterization of rhodamine B hydroxylamide as a highly selective and sensitive fluorescence probe for copper(II). *Anal Chim Acta* **632**, 9-14, doi: 10.1016/j.aca.2007.08.025.

53. Martinez-Rivera M & Siddik ZH (2012) Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol* **83**, 1049-1062, doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.026.
54. Dong P, Xu Z, Jia N, Li D & Feng Y (2009) Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway. *Mol Cancer* **8**, 103, doi: 10.1186/1476-4598-8-103.
55. Li B, Cheng Q, Li Z & Chen J (2010) p53 inactivation by MDM2 and MDMX negative feedback loops in testicular germ cell tumors. *Cell Cycle* **9**, 1411-1420.
56. Hafsi S, Pezzino FM, Candido S, Ligresti G, Spandidos DA, Soua Z, McCubrey JA, Travali S & Libra M (2012) Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int J Oncol* **40**, 639-644, doi: 10.3892/ijo.2011.1312.
57. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, et al. (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**, 3379-3389.
58. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Knabb JR, Papa S, Kuntzen C & Franzoso G (2007) Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* **27**, 3920-3935, doi: 10.1128/MCB.01219-06.
59. Chun EH, Gonzales L, Lewis FS, Jones J & Rutman RJ (1969) Differences in the in vivo alkylation and cross-linking of nitrogen mustard-sensitive and -resistant lines of Lettre-Ehrlich asites tumors. *Cancer research* **29**, 1184-1194.
60. Biedler JL & Riehm H (1970) Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer research* **30**, 1174-1184.
61. Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et biophysica acta* **323**, 466-483.
62. Juliano RL & Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta* **455**, 152-162.
63. Riordan JR & Ling V (1979) Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *The Journal of biological chemistry* **254**, 12701-12705.
64. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM & Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**, 381-389.
65. Dean M & Allikmets R (2001) Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr* **33**, 475-479.

66. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM & Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654.
67. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK & Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15665-15670.
68. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, et al. (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer research* **59**, 8-13.
69. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V & Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer research* **58**, 5337-5339.
70. Higgins CF, Gallagher MP, Mimmack ML & Pearce SR (1988) A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays* **8**, 111-116, doi: 10.1002/bies.950080406.
71. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
72. Pu QQ & Bezwoda WR (1999) Induction of alkylator (melphalan) resistance in HL60 cells is accompanied by increased levels of topoisomerase II expression and function. *Mol Pharmacol* **56**, 147-153.
73. Zhang JT (2007) Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Res* **17**, 311-323, doi: 10.1038/cr.2007.15.
74. Jones PM & George AM (2013) Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 39-50, doi: 10.3109/10409238.2012.735644.
75. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G & Varadi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* **86**, 1179-1236, doi: 10.1152/physrev.00037.2005.
76. Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C & Sarkadi B (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* **13**, 379-393, doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.010.
77. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, et al. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **323**, 1718-1722, doi: 10.1126/science.1168750.

78. Martinez L, Arnaud O, Henin E, Tao H, Chaptal V, Doshi R, Andrieu T, Dussurgey S, Tod M, Di Pietro A, et al. (2014) Understanding polyspecificity within the substrate-binding cavity of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Febs J* **281**, 673-682, doi: 10.1111/febs.12613.
79. Turk D & Szakacs G (2009) Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**, 246-252.
80. Clarke R, Leonessa F & Trock B (2005) Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis. *Semin Oncol* **32**, S9-15, doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.09.009.
81. Atalay C, Demirkazik A & Gunduz U (2008) Role of ABCB1 and ABCC1 gene induction on survival in locally advanced breast cancer. *J Chemother* **20**, 734-739, doi: 10.1179/joc.2008.20.6.734.
82. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G & Nooter K (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* **9**, 827-836.
83. Triller N, Korosec P, Kern I, Kosnik M & Debeljak A (2006) Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* **54**, 235-240, doi: 10.1016/j.lungcan.2006.06.019.
84. Ushijima R, Takayama K, Izumi M, Harada T, Horiuchi Y, Uchino J, Hara N & Nakanishi Y (2007) Immunohistochemical expression of MRP2 and clinical resistance to platinum-based chemotherapy in small cell lung cancer. *Anticancer Res* **27**, 4351-4358.
85. Bates SE, Bakke S, Kang M, Robey RW, Zhai S, Thambi P, Chen CC, Patil S, Smith T, Steinberg SM, et al. (2004) A phase I/II study of infusional vinblastine with the P-glycoprotein antagonist valspodar (PSC 833) in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 4724-4733, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0829-03.
86. Karaszi E, Jakab K, Homolya L, Szakacs G, Hollo Z, Telek B, Kiss A, Rejto L, Nahajevszky S, Sarkadi B, et al. (2001) Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **112**, 308-314.
87. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, et al. (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4028-4033.
88. Chen C, Liu X & Smith BJ (2003) Utility of *Mdr1*-gene deficient mice in assessing the impact of P-glycoprotein on pharmacokinetics and pharmacodynamics in drug discovery and development. *Curr Drug Metab* **4**, 272-291.

89. Polli JW, Jarrett JL, Studenberg SD, Humphreys JE, Dennis SW, Brouwer KR & Woolley JL (1999) Role of P-glycoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor. *Pharm Res* **16**, 1206-1212.
90. Yokogawa K, Takahashi M, Tamai I, Konishi H, Nomura M, Moritani S, Miyamoto K & Tsuji A (1999) P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm Res* **16**, 1213-1218.
91. Konig J, Muller F & Fromm MF (2013) Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev* **65**, 944-966, doi: 10.1124/pr.113.007518.
92. Fenner KS, Troutman MD, Kempshall S, Cook JA, Ware JA, Smith DA & Lee CA (2009) Drug-drug interactions mediated through P-glycoprotein: clinical relevance and in vitro-in vivo correlation using digoxin as a probe drug. *Clin Pharmacol Ther* **85**, 173-181, doi: 10.1038/clpt.2008.195.
93. Kuzuya T, Kobayashi T, Moriyama N, Nagasaka T, Yokoyama I, Uchida K, Nakao A & Nabeshima T (2003) Amlodipine, but not MDR1 polymorphisms, alters the pharmacokinetics of cyclosporine A in Japanese kidney transplant recipients. *Transplantation* **76**, 865-868, doi: 10.1097/01.TP.0000084873.20157.67.
94. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, et al. (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 215-236, doi: 10.1038/nrd3028.
95. Schwarz UI, Hanso H, Oertel R, Miehle S, Kuhlisch E, Glaeser H, Hitzl M, Dresser GK, Kim RB & Kirch W (2007) Induction of intestinal P-glycoprotein by St John's wort reduces the oral bioavailability of talinolol. *Clin Pharmacol Ther* **81**, 669-678, doi: 10.1038/sj.clpt.6100191.
96. Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O, Wiltshire HR & Schinkel AH (1999) Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* **104**, 1441-1447, doi: 10.1172/JCI7963.
97. Pavsek P, Staud F, Fendrich Z, Sklenarova H, Libra A, Novotna M, Kopecky M, Nobilis M & Semecky V (2003) Examination of the functional activity of P-glycoprotein in the rat placental barrier using rhodamine 123. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 1239-1250, doi: 10.1124/jpet.102.048470.
98. Mross K, Bohn C, Edler L, Jonat W, Queisser W, Heidemann E, Goebel M & Hossfeld DK (1993) Randomized phase II study of single-agent epirubicin +/- verapamil in patients with advanced metastatic breast cancer. An AIO clinical trial. Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie of the German Cancer Society. *Ann Oncol* **4**, 45-50.
99. Wishart GC, Bissett D, Paul J, Jodrell D, Harnett A, Habeshaw T, Kerr DJ, Macham MA, Soukop M, Leonard RC, et al. (1994) Quinidine as a resistance modulator of epirubicin in advanced breast cancer: mature results of a placebo-controlled randomized trial. *J Clin Oncol* **12**, 1771-1777.

100. Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, Facchini T, Goudier MJ, Krakowski I, Netter-Pinon G, Frenay M, Gousset C, Marie FN, et al. (2000) Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* **11**, 1471-1476.
101. Saeki T, Nomizu T, Toi M, Ito Y, Noguchi S, Kobayashi T, Asaga T, Minami H, Yamamoto N, Aogi K, et al. (2007) Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 411-417, doi: 10.1200/JCO.2006.08.1646.
102. Nobili S, Landini I, Mazzei T & Mini E (2012) Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Med Res Rev* **32**, 1220-1262, doi: 10.1002/med.20239.
103. Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ & Assaraf YG (2011) Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Updat* **14**, 150-163, doi: 10.1016/j.drug.2011.01.003.
104. Chen Y, Wu JJ & Huang L (2010) Nanoparticles targeted with NGR motif deliver c-myc siRNA and doxorubicin for anticancer therapy. *Mol Ther* **18**, 828-834, doi: 10.1038/mt.2009.291.
105. Szybalski W & Bryson V (1952) Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J Bacteriol* **64**, 489-499.
106. Podlesek Z, Comino A, Herzog-Velikonja B & Grabnar M (2000) The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 103-106.
107. Bohn C & Bouloc P (1998) The *Escherichia coli* cmlA gene encodes the multidrug efflux pump Cmr/MdfA and is responsible for isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside exclusion and spectinomycin sensitivity. *J Bacteriol* **180**, 6072-6075.
108. Hall MD, Handley MD & Gottesman MM (2009) Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 546-556, doi: 10.1016/j.tips.2009.07.003.
109. Rank GH & Bech-Hansen NT (1973) Single nuclear gene inherited cross resistance and collateral sensitivity to 17 inhibitors of mitochondrial function in *S. cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **126**, 93-102.
110. Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu AB, Bray PG & Ward SA (2004) Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* **15**, 867-877, doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.012.
111. Bech-Hansen NT, Till JE & Ling V (1976) Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol* **88**, 23-31, doi: 10.1002/jcp.1040880104.

112. Juliano RL & Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**, 152-162.
113. Riordan JR & Ling V (1979) Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* **254**, 12701-12705.
114. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, et al. (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6**, 861-871.
115. Goffeau A (2008) Drug resistance: the fight against fungi. *Nature* **452**, 541-542, doi: 10.1038/452541a.
116. Rank GH, Robertson AJ & Phillips KL (1975) Modification and inheritance of pleiotropic cross resistance and collateral sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 783-793.
117. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG & Pina-Vaz C (2009) Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. *FEMS Yeast Res* **9**, 618-625, doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00504.x.
118. Milewski S, Mignini F, Prasad R & Borowski E (2001) Unusual susceptibility of a multidrug-resistant yeast strain to peptidic antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 223-228, doi: 10.1128/aac.45.1.223-228.2001.
119. Egan TJ (2006) Interactions of quinoline antimalarials with hematin in solution. *J Inorg Biochem* **100**, 916-926, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.11.005.
120. Jensen PB, Holm B, Sorensen M, Christensen IJ & Sehested M (1997) In vitro cross-resistance and collateral sensitivity in seven resistant small-cell lung cancer cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, taxol, topotecan and gemcitabine. *Br J Cancer* **75**, 869-877.
121. Poruchynsky MS, Kim JH, Nogales E, Annable T, Loganzo F, Greenberger LM, Sackett DL & Fojo T (2004) Tumor cells resistant to a microtubule-depolymerizing hemiasterlin analogue, HTI-286, have mutations in alpha- or beta-tubulin and increased microtubule stability. *Biochemistry* **43**, 13944-13954, doi: 10.1021/bi049300+.
122. Beretta GL, Gatti L, Perego P & Zaffaroni N (2013) Camptothecin resistance in cancer: insights into the molecular mechanisms of a DNA-damaging drug. *Curr Med Chem* **20**, 1541-1565.
123. Tan KB, Mattern MR, Boyce RA, Hertzberg RP & Schein PS (1987) Elevated topoisomerase II activity and altered chromatin in nitrogen mustard-resistant human cells. *NCI Monogr*, 95-98.



124. Hari M, Loganzo F, Annable T, Tan X, Musto S, Morilla DB, Nettles JH, Snyder JP & Greenberger LM (2006) Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules. *Mol Cancer Ther* **5**, 270-278, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0190.
125. Rappa G, Gamcsik MP, Mitina RL, Baum C, Fodstad O & Lorico A (2003) Retroviral transfer of MRP1 and gamma-glutamyl cysteine synthetase modulates cell sensitivity to L-buthionine-S,R-sulphoximine (BSO): new rationale for the use of BSO in cancer therapy. *Eur J Cancer* **39**, 120-128.
126. Trompier D, Chang XB, Barattin R, du Moulinet D'Hardemare A, Di Pietro A & Baubichon-Cortay H (2004) Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. *Cancer research* **64**, 4950-4956, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0143.
127. Laberge RM, Karwatsky J, Lincoln MC, Leimanis ML & Georges E (2007) Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **73**, 1727-1737, doi: 10.1016/j.bcp.2007.02.005.
128. Porter CW, Ganis B, Rustum Y, Wrzosek C, Kramer DL & Bergeron RJ (1994) Collateral sensitivity of human melanoma multidrug-resistant variants to the polyamine analogue, N1,N11-diethylnorspermine. *Cancer research* **54**, 5917-5924.
129. Bergman AM, Pinedo HM, Talianidis I, Veerman G, Loves WJ, van der Wilt CL & Peters GJ (2003) Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer* **88**, 1963-1970, doi: 10.1038/sj.bjc.6601011.
130. Karwatsky J, Lincoln MC & Georges E (2003) A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry* **42**, 12163-12173, doi: 10.1021/bi034149+.
131. Ludwig JA, Szakacs G, Martin SE, Chu BF, Cardarelli C, Sauna ZE, Caplen NJ, Fales HM, Ambudkar SV, Weinstein JN, et al. (2006) Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer research* **66**, 4808-4815, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3322.
132. Bergman AM, Munch-Petersen B, Jensen PB, Sehested M, Veerman G, Voorn DA, Smid K, Pinedo HM & Peters GJ (2001) Collateral sensitivity to gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) and cytosine arabinoside of daunorubicin- and VM-26-resistant variants of human small cell lung cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* **61**, 1401-1408.
133. Loe DW & Sharom FJ (1993) Interaction of multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells with amphiphiles. *Br J Cancer* **68**, 342-351.
134. Li-Blatter X, Nervi P & Seelig A (2009) Detergents as intrinsic P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 2335-2344, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.07.010.

135. Schuurhuis GJ, Pinedo HM, Broxterman HJ, van Kalken CK, Kuiper CM & Lankelma J (1990) Differential sensitivity of multi-drug-resistant and -sensitive cells to resistance-modifying agents and the relation with reversal of anthracycline resistance. *International journal of cancer Journal international du cancer* **46**, 330-336.
136. Laberge RM, Ambadipudi R & Georges E (2009) P-glycoprotein (ABCB1) modulates collateral sensitivity of a multidrug resistant cell line to verapamil. *Arch Biochem Biophys* **491**, 53-60, doi: 10.1016/j.abb.2009.09.012.
137. Kaplan O, Jaroszewski JW, Clarke R, Fairchild CR, Schoenlein P, Goldenberg S, Gottesman MM & Cohen JS (1991) The multidrug resistance phenotype: 31P nuclear magnetic resonance characterization and 2-deoxyglucose toxicity. *Cancer research* **51**, 1638-1644.
138. Lyon RC, Cohen JS, Faustino PJ, Megnin F & Myers CE (1988) Glucose metabolism in drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells monitored by magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research* **48**, 870-877.
139. Bentley J, Quinn DM, Pitman RS, Warr JR & Kellett GL (1997) The human KB multidrug-resistant cell line KB-C1 is hypersensitive to inhibitors of glycosylation. *Cancer Lett* **115**, 221-227.
140. Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY & Kabanov AV (2001) Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br J Cancer* **85**, 1987-1997, doi: 10.1054/bjoc.2001.2165.
141. Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, et al. (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* **6**, 129-137, doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.026.
142. Monga M & Sausville EA (2002) Developmental therapeutics program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia* **16**, 520-526, doi: 10.1038/sj.leu.2402464.
143. Stinson SF, Alley MC, Kopp WC, Fiebig HH, Mullendore LA, Pittman AF, Kenney S, Keller J & Boyd MR (1992) Morphological and immunocytochemical characteristics of human tumor cell lines for use in a disease-oriented anticancer drug screen. *Anticancer Res* **12**, 1035-1053.
144. Shoemaker RH (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* **6**, 813-823, doi: 10.1038/nrc1951.
145. Wang H, Klinginsmith J, Dong X, Lee AC, Guha R, Wu Y, Crippen GM & Wild DJ (2007) Chemical data mining of the NCI human tumor cell line database. *J Chem Inf Model* **47**, 2063-2076, doi: 10.1021/ci700141x.
146. Willett P (2006) Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discov Today* **11**, 1046-1053, doi: 10.1016/j.drudis.2006.10.005.

147. Shen DW, Cardarelli C, Hwang J, Cornwell M, Richert N, Ishii S, Pastan I & Gottesman MM (1986) Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins. *The Journal of biological chemistry* **261**, 7762-7770.
148. Cardarelli CO, Aksentijevich I, Pastan I & Gottesman MM (1995) Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters. *Cancer research* **55**, 1086-1091.
149. Wang E, Lee MD & Dunn KW (2000) Lysosomal accumulation of drugs in drug-sensitive MES-SA but not multidrug-resistant MES-SA/Dx5 uterine sarcoma cells. *Journal of cellular physiology* **184**, 263-274, doi: 10.1002/1097-4652(200008)184:2<263::AID-JCP15>3.0.CO;2-F.
150. Ujhelly O, Ozvegy C, Varady G, Cervenak J, Homolya L, Grez M, Scheffer G, Roos D, Bates SE, Varadi A, et al. (2003) Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther* **14**, 403-412, doi: 10.1089/104303403321209005.
151. Raguz S, Adams C, Masrour N, Rasul S, Papoutsoglou P, Hu Y, Cazzanelli G, Zhou Y, Patel N, Coombes C, et al. (2013) Loss of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase confers collateral sensitivity to carmustine in topoisomerase II-mediated doxorubicin resistant triple negative breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **85**, 186-196, doi: 10.1016/j.bcp.2012.10.020.
152. Szakacs G, Ozvegy C, Bakos E, Sarkadi B & Varadi A (2001) Role of glycine-534 and glycine-1179 of human multidrug resistance protein (MDR1) in drug-mediated control of ATP hydrolysis. *Biochem J* **356**, 71-75.
153. Kolacsek O, Krizsik V, Schamberger A, Erdei Z, Apati A, Varady G, Mates L, Izsvak Z, Ivics Z, Sarkadi B, et al. (2011) Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mob DNA* **2**, 5, doi: 10.1186/1759-8753-2-5.
154. Izsvak Z, Ivics Z & Plasterk RH (2000) Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* **302**, 93-102, doi: 10.1006/jmbi.2000.4047.
155. Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, et al. (2009) Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* **41**, 753-761, doi: 10.1038/ng.343.
156. Homolya L, Hollo M, Muller M, Mechetner EB & Sarkadi B (1996) A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer* **73**, 849-855.
157. Antholine W, Knight J, Whelan H & Petering DH (1977) Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems. *Mol Pharmacol* **13**, 89-98.

158. Finch RA, Liu MC, Cory AH, Cory JG & Sartorelli AC (1999) Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Adv Enzyme Regul* **39**, 3-12.
159. Hall IH, Lackey CB, Kistler TD, Durham RW, Jr., Jouad EM, Khan M, Thanh XD, Djebbar-Sid S, Benali-Baitich O & Bouet GM (2000) Cytotoxicity of copper and cobalt complexes of furfural semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives in murine and human tumor cell lines. *Pharmazie* **55**, 937-941.
160. Byrnes RW, Antholine WE & Petering DH (1992) Interactions of 1,10-phenanthroline and its copper complex with Ehrlich cells. *Free Radic Biol Med* **12**, 457-469.
161. Pierre JL, Baret P & Serratrice G (2003) Hydroxyquinolines as iron chelators. *Curr Med Chem* **10**, 1077-1084.
162. Kovacic P (2007) Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: clinical implications. *Med Hypotheses* **69**, 510-516, doi: 10.1016/j.mehy.2006.08.046.
163. Huang DS, Whang TJ, Cheng FC, Wu YP, Wang YT, Luo WI & Wang YS (2005) Toxicity assessment of mono-substituted benzenes and phenols using a *Pseudomonas* initial oxygen uptake assay. *Environ Toxicol Chem* **24**, 253-260.
164. Takada Y, Yamada K, Taguchi Y, Kino K, Matsuo M, Tucker SJ, Komano T, Amachi T & Ueda K (1998) Non-equivalent cooperation between the two nucleotide-binding folds of P-glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta* **1373**, 131-136.
165. Izsvak Z, Chuah MK, Vandendriessche T & Ivics Z (2009) Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors. *Methods* **49**, 287-297, doi: 10.1016/j.ymeth.2009.07.001.
166. Heffeter P, Jakupec MA, Korner W, Chiba P, Pirker C, Dornetshuber R, Elbling L, Sutterluty H, Micksche M, Keppler BK, et al. (2007) Multidrug-resistant cancer cells are preferential targets of the new antineoplastic lanthanum compound KP772 (FFC24). *Biochem Pharmacol* **73**, 1873-1886, doi: 10.1016/j.bcp.2007.03.002.
167. Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM & Melo JV (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **101**, 2368-2373, doi: 10.1182/blood.V101.6.2368.
168. Goldsborough AS, Handley MD, Dulcey AE, Pluchino KM, Kannan P, Brimacombe KR, Hall MD, Griffiths G & Gottesman MM (2011) Collateral sensitivity of multidrug-resistant cells to the orphan drug tiopronin. *J Med Chem* **54**, 4987-4997, doi: 10.1021/jm2001663.
169. Nakagawa-Goto K, Chang PC, Lai CY, Hung HY, Chen TH, Wu PC, Zhu H, Sedykh A, Bastow KF & Lee KH (2010) Antitumor agents. 280. Multidrug resistance-selective desmosmumotin B analogues. *J Med Chem* **53**, 6699-6705, doi: 10.1021/jm100846r.

170. Hall MD, Salam NK, Hellawell JL, Fales HM, Kensler CB, Ludwig JA, Szakacs G, Hibbs DE & Gottesman MM (2009) Synthesis, activity, and pharmacophore development for isatin-beta-thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. *J Med Chem* **52**, 3191-3204, doi: 10.1021/jm800861c.
171. Noulisri E, Richardson DR, Lerdwana S, Fucharoen S, Yamagishi T, Kalinowski DS & Pattanapanyasat K (2009) Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells. *Am J Hematol* **84**, 170-176, doi: 10.1002/ajh.21350.
172. van Osdol WW, Myers TG, Paull KD, Kohn KW & Weinstein JN (1994) Use of the Kohonen self-organizing map to study the mechanisms of action of chemotherapeutic agents. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1853-1859.
173. Rabow AA, Shoemaker RH, Sausville EA & Covell DG (2002) Mining the National Cancer Institute's tumor-screening database: identification of compounds with similar cellular activities. *J Med Chem* **45**, 818-840.
174. Richardson DR (2005) Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer. *Curr Med Chem* **12**, 2711-2729.
175. Yu Y, Wong J, Lovejoy DB, Kalinowski DS & Richardson DR (2006) Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res* **12**, 6876-6883, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1954.
176. Torti SV & Torti FM (2013) Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* **13**, 342-355, doi: 10.1038/nrc3495.
177. Gatlik-Landwojtowicz E, Aanismaa P & Seelig A (2004) The rate of P-glycoprotein activation depends on the metabolic state of the cell. *Biochemistry* **43**, 14840-14851, doi: 10.1021/bi048761s.
178. Al-Shawi MK (2011) Catalytic and transport cycles of ABC exporters. *Essays Biochem* **50**, 63-83, doi: 10.1042/bse0500063.
179. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL & Dang CV (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**, 177-185, doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.
180. Ruiz JC, Choi KH, von Hoff DD, Roninson IB & Wahl GM (1989) Autonomously replicating episomes contain *mdr1* genes in a multidrug-resistant human cell line. *Mol Cell Biol* **9**, 109-115.
181. Chen KG, Wang YC, Schaner ME, Francisco B, Duran GE, Juric D, Huff LM, Padilla-Nash H, Ried T, Fojo T, et al. (2005) Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line. *Cancer research* **65**, 9388-9397, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4133.
182. Baker EK, Johnstone RW, Zalberg JR & El-Osta A (2005) Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **24**, 8061-8075, doi: 10.1038/sj.onc.1208955.

